

Université de Montréal

Interactions neurohumorales et signalisations cellulaires impliquées dans le
remodelage hypertrophique des artères de résistance: Rôle central de
l'endothéline

par

Pierre Beaucage

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques
(Option pharmacologie)

Mai 2005

©Pierre Beaucage, 2005



QV

705

U58

2006

V.001

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
Interactions neurohumorales et signalisations cellulaires impliquées dans le
remodelage hypertrophique des artères de résistance :
Rôle central de l'endothéline

Par
Pierre Beaucage

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Daniel Lamontagne Ph.D
Président-rapporteur

Pierre Moreau Ph.D
Directeur de recherche

René Cardinal Ph.D
Membre interne

Paul Poirier MD Ph.D
Examineur externe

Représentant du doyen de la FES

Sommaire en français

L'hypertension artérielle se caractérise par une augmentation de la pression artérielle qui à long terme entraîne un dommage des organes vitaux, comme le cœur, les reins et le cerveau. Nous pensons que des mécanismes d'adaptation sont enclenchés suite à l'élévation de la pression et modifieraient la structure des artères de résistance pour en augmenter le rapport média-lumière qui pourrait alors contribuer aux dommages des organes cibles. De plus, des efforts considérables ont été investis dans le but de mieux comprendre le rôle de l'endothélium vasculaire dans le développement des maladies cardiovasculaires. L'objectif de cette thèse est donc de démontrer le rôle central de l'endothéline (ET) dans le développement du remodelage vasculaire hypertrophique.

Dans l'hypertension artérielle, plusieurs systèmes neurohumoraux comme les systèmes rénine-angiotensine (SRA), nerveux sympathique (SNS) ainsi que l'endothéline (ET) sont altérés et ils contribueraient au développement de cet état physiopathologique. L'objectif du premier travail de cette thèse consiste donc à déterminer les interactions qui s'établissent entre ces systèmes et l'ET, *in vivo*, dans le contrôle précoce de l'hypertrophie de la paroi vasculaire. De plus, il est important d'évaluer si ces interactions impliquant le SRA, le SNS et l'ET dans l'établissement de l'hypertrophie vasculaire sont identiques entre les artères de conductance et de résistance. Les résultats de nos travaux suggèrent qu'il existe des interactions spécifiques entre ces deux systèmes et l'ET. Selon le territoire vasculaire étudié, le SRA, le SNS et l'ET interagissent dans un ordre précis afin d'induire la synthèse protéique vasculaire. Aun niveau des artères de résistance, l'Ang II se retrouverait en amont du SNS et l'ET constituerait le médiateur le plus en aval dans cette cascade d'interactions menant à l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire. Toutefois, dans les artères de conductance le SNS semble être le facteur le plus aval dans cette cascade d'interactions impliquée dans la régulation de la croissance de la paroi vasculaire.

Dans un deuxième et troisième projets, nous avons exploré, dans les petites artères de résistances, les mécanismes intra-cellulaires sous-jacents aux interactions entre le SRA,

l'ET et la hausse de la synthèse protéique de la paroi vasculaire. Des évidences de plus en plus importantes démontrent que l'ET est essentiel à l'établissement de l'hypertrophie des vaisseaux de résistance, suite à une stimulation à l'angiotensine II (Ang II). Nous avons donc caractérisé des événements intra-cellulaires expliquant l'interaction entre le SRA, l'ET et l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire. Les résultats obtenus démontrent que certains éléments de signalisation courants, comme les kinases de la famille Src, le récepteur à l'EGF et ERK 1/2 sont impliqués dans la production vasculaire de l'ET. De plus, ces mêmes éléments de signalisation ne semblent pas contribuer, en aval de l'ET, à l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire.

Le rôle de l'endothélium vasculaire va au-delà du contrôle de la pression artérielle. Les travaux de cette thèse ont permis de mieux définir le rôle central de l'ET dans le remodelage des petites artères de résistance. Nos efforts de recherche suggèrent que l'ET constitue un médiateur local vers lequel les systèmes neurohumoraux convergent afin d'induire l'hypertrophie des artères de résistance. Ainsi, le ciblage des récepteurs de l'ET pourrait améliorer plusieurs conditions physiopathologiques menant à l'hypertension artérielle et apporter une protection supplémentaire contre les dommages des organes cibles associé au développement de cette pathologie.

Mots clés : remodelage hypertrophique, système rénine-angiotensine, système sympathique, endothéline, norépinéphrine, angiotensine II, tyrosine kinase SRC, ERK 1/2, récepteur à l'EGF.

Sommaire en anglais

Hypertension, which is defined as an elevation of blood pressure, leads subsequently to serious damages to vital organs. It is likely that adaptative mechanisms are important in the pathophysiological development of the complications of hypertension and could include vascular hypertrophic remodeling of small resistance arteries. Moreover, endothelial dysfunction is proposed as an important component of this process. This may explain the reason why numerous studies have focused on the endothelium and its role in the development of cardiovascular diseases. The aim of this thesis is to demonstrate the ubiquitous role of endothelin in the development of vascular hypertrophic remodeling of small resistance arteries.

Neurohumoral changes could contribute to the pathophysiological development of hypertension. This involves the renin-angiotensin system, the sympathetic nervous system and endothelin. The aim of the first manuscript was to explore the early growth interactions between the renin-angiotensin system, the sympathetic nervous system and endothelin in the control of vascular hypertrophy *in vivo*. Moreover, it was important to evaluate if the interactions involved in the vascular hypertrophy was the same between conduit and small resistance arteries. From our results, it appears that the aorta and small mesenteric arteries use a different pattern of local recruitment for their protein synthesis regulation. In resistance arteries, the renin angiotensin system seems to be upstream in the cascade of interactions, activating the local sympathetic nervous system, which, in turn, triggers the release of endothelin to produce protein synthesis. However, in conduit arteries, the local sympathetic nervous system appears to be the final system dictating the growth process.

In a second and third manuscript, we explored the signaling pathways involve in the interaction between angiotensin and endothelin in the control of vascular protein synthesis. Following angiotensin stimulation, previous results suggested that endothelin is essential to the establishment of the vascular hypertrophy of resistance arteries. Thus, we evaluated different signaling events involved in the angiotensin – endothelin interaction and vascular protein synthesis. The results obtained showed the contribution

of signaling components, such as Src tyrosine kinases, EGF receptors and ERK 1/2 in the production of endothelin. However, these signaling events did not appear to contribute to the trophic signaling of endothelin.

In conclusion, the role of vascular endothelium implies more than blood pressure control. The work presented in this thesis have allowed us to better determine the ubiquitous role of endothelin in the vascular remodeling of resistance small arteries. Thus, targeting the endothelin receptors should bring an additionnal protection in many cardiovascular diseases where different regulatory systems are outbalanced, in order to prevent target-organ damage.

Key words: vascular remodeling, renin-angiotensin system, sympathetic nervous system, endothelin, norepinephrine, angiotensin, Src tyrosine kinase, ERK 1/2, EGF receptor.

Table des matières

SOMMAIRE EN FRANÇAIS	III
SOMMAIRE EN ANGLAIS	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XIV
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1 LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE: ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES	1
1.1.1 L'impact et les facteurs de risques associés au développement des maladies cardiovasculaires	1
1.1.2 L'hypertension artérielle, le remodelage artériel et la protection des organes cibles	2
1.2 L'HOMÉOSTASIE DU SYSTÈME VASCULAIRE	4
1.2.1 Aperçu du système vasculaire	4
1.2.2 La structure histologique de l'arbre artériel	5
<i>L'intima</i>	7
<i>La média</i>	8
<i>L'adventice</i>	9
1.2.3 La structure et le rôle des artères de conductance	10
<i>Les artères élastiques</i>	10
<i>Les artères musculaires</i>	11
1.2.4 L'importance des artères de résistance	12
<i>La localisation des artères de résistance</i>	12
<i>La structure des artères de résistance</i>	13
<i>Le rôle des artères de résistance</i>	14
1.2.5 La régulation de la pression artérielle	16
<i>La complexité du contrôle de la pression artérielle moyenne</i>	16
<i>Les facteurs influençant la composante systolique</i>	18
<i>Les facteurs influençant la composante diastolique</i>	19
<i>Quelle composante de la pression artérielle est la plus importante ?</i>	20
1.3 L'HYPERTENSION	24
1.3.1 L'hypertension artérielle	24
<i>Généralités</i>	24
1.3.2 L'hypertension artérielle et la modulation neurohumorale	25
1.3.3 Le système rénine-angiotensine et l'hypertension	25

<i>La biosynthèse classique de l'angiotensine II</i>	25
<i>La biosynthèse locale de l'angiotensine II</i>	28
<i>Les types de récepteurs à l'angiotensine II et leur localisation</i>	28
<i>Les effets physiologiques de l'angiotensine II</i>	30
<i>La modulation et le blocage du système rénine-angiotensine dans l'hypertension artérielle</i>	32
1.3.4 Le système sympathique et l'hypertension artérielle	35
<i>La biosynthèse, la recapture et le catabolisme des catécholamines</i>	35
<i>Les médullo-surrénales</i>	39
<i>Les récepteurs du système sympathique et leur localisation</i>	40
<i>L'auto- et l'hétéro-modulation de la neurotransmission</i>	42
<i>Les effets physiologiques des catécholamines</i>	43
<i>Le blocage et la modulation du système nerveux sympathique dans l'hypertension</i>	44
1.3.5 L'endothélium et l'hypertension	47
<i>Les médiateurs endothéliaux vasodilatateurs</i>	47
<i>Les médiateurs endothéliaux vasoconstricteurs</i>	53
1.3.6 L'endothéline, un médiateur important dans l'hypertension	57
<i>La biosynthèse, la libération et la régulation de l'endothéline</i>	57
<i>Les types de récepteurs à l'endothéline et leur localisation</i>	58
<i>Les effets physiologiques de l'endothéline</i>	59
<i>Le blocage du système de l'endothéline dans l'hypertension artérielle</i>	62
1.3.7 Les interactions entre le système nerveux sympathique, le système rénine-angiotensine et l'endothéline dans le développement de l'hypertension	65
<i>L'interaction entre les systèmes rénine-angiotensine et sympathique</i>	65
<i>L'interaction entre le système rénine-angiotensine et l'endothéline</i>	67
<i>L'interaction entre le système sympathique et l'endothéline</i>	69
1.3.8 Les différents types d'hypertension	71
<i>Hypertension essentielle</i>	71
<i>Hypertension secondaire</i>	73
<i>Hypertension systolique isolée</i>	75
<i>Hypertension pulmonaire</i>	76
1.4 L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE ET LE REMODELAGE VASCULAIRE	77
1.4.1 Les types de remodelage vasculaire	79
<i>Le remodelage eutrophique</i>	79
<i>Le remodelage hypertrophique</i>	82
<i>Le remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur ou expansif</i>	84
1.4.2 Le système rénine-angiotensine et le remodelage vasculaire hypertrophique	86
<i>L'angiotensine II et le remodelage vasculaire des artères de résistance in vivo</i>	86
<i>L'angiotensine II et le remodelage vasculaire des artères de conductance in vivo</i>	87
<i>L'angiotensine II et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires</i>	88
<i>L'angiotensine II et l'induction de l'apoptose</i>	90
<i>L'angiotensine II et la prolifération de la matrice extra-cellulaire</i>	91
<i>L'angiotensine II et l'inflammation</i>	93
1.4.3 Le système nerveux sympathique et le remodelage vasculaire hypertrophique	94
<i>Le système nerveux sympathique et le remodelage des artères de résistance in vivo</i>	94
<i>Le système nerveux sympathique et le remodelage des artères de conductance in vivo</i>	96
<i>Les récepteurs adrénergiques pertinents au remodelage vasculaire</i>	97
1.4.4 L'endothéline et le remodelage vasculaire hypertrophique	99
<i>L'endothéline et le remodelage vasculaire des artères de résistance in vivo</i>	99
<i>L'endothéline et l'induction du remodelage vasculaire hypertrophique in vivo</i>	101
<i>L'endothéline et le remodelage vasculaire des artères de conductance in vivo</i>	104
<i>L'endothéline, la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires</i>	105
<i>L'endothéline et la prolifération de la matrice extra-cellulaire</i>	107
1.4.5 Le remodelage vasculaire hypertrophique et les interactions entre le système rénine-angiotensine, le système sympathique et l'endothéline	109
<i>L'interaction entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique</i>	109

<i>L'interaction entre le système rénine-angiotensine et l'endothéline</i>	111
<i>L'interaction entre le système nerveux sympathique et l'endothéline</i>	114
1.5 LA SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉE DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE HYPERTROPHIQUE	116
1.5.1 La signalisation cellulaire de l'angiotensine II	117
<i>L'activation du récepteur AT₁</i>	117
<i>L'activation de la phospholipase C, de la protéine kinase C et de la voie ERK 1/2</i>	117
<i>Les tyrosines kinases non-réceptorielles, des événements de signalisation situés en amont dans la cascade de signalisations cellulaires de l'angiotensine II</i>	119
<i>La transactivation des récepteurs couplés aux tyrosines kinases</i>	121
<i>L'activation de la voie de signalisation de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase</i>	124
1.5.2 La signalisation cellulaire de l'endothéline	128
<i>L'activation du récepteur ET_A</i>	128
<i>Le sentier de signalisation cellulaire ERK 1/2</i>	129
<i>La participation des tyrosines kinases non-réceptorielles en amont dans la signalisation cellulaire de l'endothéline</i>	130
<i>La transactivation du récepteur de l'EGF, un événement intra-cellulaire important aux sentiers de signalisation de l'endothéline</i>	131
<i>Le sentier de signalisation de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase</i>	131
1.6 HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE	134
1.7 OBJECTIFS GÉNÉRAUX	135
 CHAPITRE 2 : HETEROGENEITY IN THE ACUTE CONTROL OF VASCULAR PROTEIN SYNTHESIS IN VIVO	 136
2.1 ABSTRACT	137
2.2 INTRODUCTION	138
2.3 MATERIALS AND METHODS	140
2.3.1 Surgical procedures and treatments	140
2.3.2 Protein Synthesis Measurement	140
2.3.3 Catecholamine, plasma renin activity and ET measurements	141
2.3.4 Drugs and Statistical Analysis	141
2.4 RESULTS	142
2.4.1 Hemodynamic Measurements	142
2.4.2 Protein Synthesis	142
2.4.3 PRA, catecholamine and ET levels	143
2.5 DISCUSSION	144
2.5.1 Small arteries	144
2.5.2 Conduit Arteries	146
2.5.3 Hemodynamic influences	148
2.6 CONCLUSION	148
2.7 REFERENCES	150
2.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES	154

CHAPITRE 3 : POSITION OF SRC TYROSINE KINASES IN THE INTERACTION BETWEEN ANGIOTENSIN II AND ENDOTHELIN IN IN VIVO VASCULAR PROTEIN SYNTHESIS 159

3.1 ABSTRACT	160
3.2 INTRODUCTION	161
3.3 MATERIALS AND METHODS	163
3.3.1 Protein Synthesis Measurement.....	164
3.3.2 PreproET-1 mRNA levels in mesenteric arteries	164
3.3.3 Western blotting for ERK1/2	165
3.3.4 Immunoprecipitation and immunoblot analysis of Cortactin	165
3.3.5 Drugs and statistical analyses.....	166
3.4 RESULTS	167
3.5 DISCUSSION	168
3.5.1 Limitations and perspectives	170
3.6 CONCLUSION	172
3.7 REFERENCES	173
3.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES	177

CHAPITRE 4 : EGF RECEPTOR TRANSACTIVATION IN ANGIOTENSIN II AND ENDOTHELIN CONTROL OF VASCULAR PROTEIN SYNTHESIS IN VIVO 184

4.1 ABSTRACT	185
4.3 MATERIALS AND METHODS	187
4.3.1 Surgical procedures and treatments	187
4.3.2 Protein Synthesis Measurement.....	187
4.3.3 Drugs and Statistical Analysis	188
4.4 RESULTS	188
4.5 DISCUSSION	189
4.6 CONCLUSION	190
4.7 REFERENCES	191
4.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES	193

CHAPITRE 5 : DISCUSSION**196**

5.1 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS & CONTRIBUTIONS ORIGINALES	196
5.1.1 Résumé des résultats	196
5.1.2 Contributions originales	197
5.2 MODÈLE EXPÉRIMENTAL	200
5.2.1 Sélection du modèle in vivo	200
5.2.2 Critique de la procédure expérimentale	201
<i>Les avantages de l'approche in vivo</i>	201
<i>Les limitations de l'approche in vivo</i>	202
5.3 INTERACTIONS NEUROHUMORALES ET HYPERTROPHIE DE LA PAROI VASCULAIRE	204
5.3.1 Hétérogénéité vasculaire	204
5.3.2 Rôle central de l'endothéline et aspects thérapeutiques dans	205
l'hypertension artérielle	205
5.4 SIGNALISATION CELLULAIRE ASSOCIÉE AU REMODELAGE VASCULAIRE	
HYPERTROPHIQUE :	207
DIVERGENCES IN VIVO - IN VITRO, COMMENT RÉCONCILIER LES DEUX ?	207
5.4.1 Signalisations cellulaires impliquées en amont dans l'interaction angiotensine II - endothéline	207
5.4.2 Signalisations cellulaires impliquées dans l'effet de l'endothéline	210
5.5 INFLUENCES CARDIOVASCULAIRES ET RÉNALES DE L'ANGIOTENSINE II :	212
L'ENDOTHÉLINE POSSÈDE-T-IL UN RÔLE CENTRAL ?	212
5.5.1 Territoire artériel	212
<i>Dysfonction endothéliale</i>	213
<i>Remodelage vasculaire hypertrophique</i>	214
5.5.2 Remodelage cardiaque	215
5.5.3 Interactions rénales	217
5.6 RÔLE CENTRAL DE L'ENDOTHÉLINE DANS L'EFFET DE L'ANGIOTENSINE II CHEZ	
L'HUMAIN	220
5.6.1 Hypertension artérielle et expression de l'ET chez l'humain	220
5.6.2 Remodelage des artères de résistance et hypertension rénovasculaire	222
5.6.3 Obésité et importance de l'interaction angiotensine II – endothéline	224
5.6.4 Blocage du système rénine angiotensine et amélioration de la fonction des artères de résistance chez les transplantés rénaux : Rôle de l'endothéline ?	226
5.7 BLOCAGE MIXTE, ENDOTHÉLINE - ANGIOTENSINE II ET PERSPECTIVES FUTURES	228
5.8 RÉSUMÉ ET CONCLUSION	232
BIBLIOGRAPHIE	234
ANNEXE	277

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Remodelage vasculaire	81
Tableau 1.2 Efficacité dans antagonistes des récepteurs à l'endothéline Prévention de l'hypertension et du remodelage vasculaire Hypertrophique	103

Liste des figures

Figure 1.1 Structure de la paroi artérielle	6
Figure 1.2 Chute de la pression artérielle moyenne à l'intérieur du système vasculaire	15
Figure 1.3 Les facteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle moyenne	17
Figure 1.4 Évolution de la PAS et de la PAD en fonction de l'âge	23
Figure 1.5 Représentation classique du système rénine-angiotensine	27
Figure 1.6 Représentation de la biosynthèse des catécholamines	37
Figure 1.7 Modulation de la neurotransmission sympathique, recapture et catabolisme de la norépinéphrine	38
Figure 1.8 Libération de facteurs vasodilatateurs dépendants de l'endothélium	48

Figure 1.9 Libération de facteurs vasoconstricteurs dépendants de l'endothélium	56
Figure 1.10 Signalisations cellulaires impliquées dans le remodelage vasculaire hypertrophique induit par l'angiotensine II	126
Figure 1.11 Signalisations cellulaires impliquées dans la transactivation du récepteur de l'EGF	127
Figure 1.12 Signalisations cellulaires impliquées dans le remodelage vasculaire hypertrophique induit par l'endothéline	133
Figure 1.13 Interactions neurohumorales et signalisations impliquées dans le remodelage hypertrophique : Rôle central de l'endothéline	199

Liste des abréviations

Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANF	Facteur natriurétique de l'oreillette
Ang	Angiotensine
AP-1	Activator protein
ARA	Antagoniste du récepteur AT ₁
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébrale
AVP	Arginine vasopressine
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
CDK	Cyclin dependent kinase
COMT	Catéchol O-méthyltransférase
COX	Cyclooxygénase
CO ₂	Gaz carbonique
CMLVs	Cellules musculaires lisses vasculaires
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EETs	Acides époxyeicosatriénoïques
EGF	Epithelial growth factor
eIF-4E	Eukariotic translation initiation factor
EPN	Endopeptidase neutre
ERKs	Extracellular signal-regulated kinases

ET	Endothéline
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FAK	Focal adhesion kinase
GMPc	Guanylate monophosphate cyclique
GTP	Guanine triphosphate
HE	Hypertension essentielle
HP	Hypertension pulmonaire
HPP	Hypertension pulmonaire primaire
HPS	Hypertension pulmonaire secondaire
hRen/hAgt	Modèle surexprimant le gène humain de la rénine et de l'angiotensinogène
HSI	Hypertension systolique isolée
IECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II
IGF	Insulin growth factor
IP3	Inositol triphosphate
LDL	Low density lipoprotein
LPA	lisophosphatidic acid
MAO	Monoamine oxidase
MAPKs	Mitogen activated protein kinases
MKP-1	MAP kinase phosphatase-1
MMP	Matrix metalloproteinase
(mRen 2) ²⁷	Modèle de rat transgénique surexprimant le gène de la rénine
mTOR	Mammian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Nitric oxide ou monoxyde d'azote
NE	Norépinéphrine
NOS	Nitric oxide synthase
OH ⁻	Hydroxyde d'hydrogène
ONOO ⁻	Peroxynitrite
O ₂	Oxygène
⁻ O ₂ ⁻	Anion superoxide

PAD	Pression artérielle diastolique
PAM	Pression artérielle moyenne
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PAS	Pression artérielle systolique
PDGF	Platelet derived growth factor
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostacycline
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
Pi3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PLC	Phospholipase C
P70S6K	Ribosomal S6 protein with a molecular weight of 70-kDa
P27kip1	Kinase inhibitor protein 1 with a molecular weight of 27-kDa
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PNMT	Phényléthanolamine-N-méthyltransférase
Pro-HB-EGF	Pro heparin-binding EGF
Pyk-2	Prolin-rich tyrosine kinase 2
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SHR-SP	Spontaneously hypertensive rat – Stroke prone
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SNS	Système nerveux sympathique
SRA	Système rénine-angiotensine
Src	Rous sarcoma
TGF _β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissu inhibitor of the MMP
TNF _α	Tumor necrosis factor _α
TP	Récepteurs aux thromboxanes/endopéroxydes
TXA ₂	Thromboxane A ₂

UBF	Upstream binding factor
WKY	Wistar-Kyoto (souche de rat)
4E-BPI	Binding protein inhibitor of eIF-4E
6-OHDA	6-hydroxydopamine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Moreau pour m'avoir confié ce merveilleux défi. Je le remercie de m'avoir encouragé et surtout d'avoir cru en moi tout au long de ces années passées dans son équipe de recherche. J'aimerais aussi souligner sa grande disponibilité et sa patience. Grâce à son support et aux nombreux conseils qu'il m'a donnés, j'ai pu acquérir une formation de haut niveau qui m'ouvrira les portes vers de nouveaux projets dans le milieu de la médecine.

La réalisation de cette thèse aurait été impossible sans la contribution de plusieurs collaborateurs. Je tiens à remercier les Drs Nobuharu Yamaguchi et Richard Larivière pour leur contribution à la réalisation de mon premier manuscrit. J'aimerais aussi remercier le Dr Rhian Touyz de l'Institut de recherches cliniques de Montréal pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir contribué au succès de mon deuxième manuscrit. De plus, j'aimerais souligner l'aide précieuse du Dr Marc Iglarz de cette même équipe de recherche. Finalement, l'expertise du Dr Marc Servant de la faculté de pharmacie a été très importante. Je tiens à le remercier, de même qu'aux membres de son équipe, pour les nombreuses discussions et les conseils judicieux qui m'ont permis d'accomplir certains travaux de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier Louise Ida Grondin, technicienne de notre équipe de recherche, sans qui la réalisation de cette thèse aurait été difficile. Je suis très reconnaissant à son égard pour son dévouement et son souci du travail bien fait. De plus, je ne pourrais oublier tous les membres étudiants de notre équipe avec lesquels j'ai échangé tout au long de mon doctorat. Je tiens à souligner leur précieuse collaboration afin de réaliser ma thèse, mais aussi je tiens à souligner les bons moments partagés à l'extérieur de l'université en leur compagnie.

Il m'est très important de souligner le support soutenu et inconditionnel de mes parents, Louise et Gilles, ainsi que de ma soeur Annie. Je les remercie pour leur grande compréhension tout au long de cette aventure. De plus, je tiens à souligner le support de

ma copine Martine qui a toujours su m'encourager et me donner de bons conseils quant à la réalisation de mon doctorat. Sa présence qui est précieuse à mes yeux ainsi que sa merveilleuse énergie ont allégé l'ampleur de mon travail.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE: ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

1.1.1 L'impact et les facteurs de risques associés au développement des maladies cardiovasculaires

Au cours du XXI^{ème} siècle, la grande majorité des populations ont pu bénéficier des percées médicales les plus impressionnantes de toute l'histoire de l'humanité¹. L'espérance de vie a augmenté considérablement avec la modernisation du XXI^{ème} siècle. Toutefois, les grands bouleversements de la structure socio-économique de nombreux pays, où la vie urbaine a tranquillement prédominé la vie rurale, ont favorisé davantage le développement de facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires². La mortalité et la morbidité qui étaient, jusqu'à ce moment, majoritairement associées à des déficiences nutritionnelles et à des maladies infectieuses, ont été dépassées par des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires¹. Plusieurs facteurs, telle une diète riche en gras saturés, un cholestérol élevé en LDL (low density lipoprotein), le diabète, l'obésité, le tabac, l'inactivité physique et l'hypertension artérielle ont été identifiés comme des facteurs de risque du développement des maladies cardiovasculaires^{1, 2}. Aujourd'hui, ces maladies chroniques se situent parmi les plus importantes causes de mortalité, expliquant pourquoi 40 % de la mortalité est imputable aux problèmes cardiovasculaires au Canada³. L'hypertension artérielle se situe au deuxième rang des causes de mortalité et constitue un facteur majeur au développement de maladies cardiovasculaires^{3, 4}. Ainsi, il semble bien établi que la probabilité de développer un problème coronarien ou un accident vasculaire cérébral (AVC) est directement associée à l'augmentation de la pression artérielle^{5, 6}. Ceci est d'autant plus important, sachant que les problèmes coronariens et les AVC sont parmi les trois premières causes de mortalité dans les pays occidentaux⁷.

1.1.2 L'hypertension artérielle, le remodelage artériel et la protection des organes cibles

Il semble donc impératif de considérer avec sérieux les causes associées au développement des maladies cardiovasculaires, et tout particulièrement l'hypertension artérielle. Cette dernière constitue un tueur silencieux qui à long terme détériore le fonctionnement des organes vitaux, comme le cœur, les reins et le cerveau. Bien que plusieurs systèmes neurohumoraux contribuent à la régulation de la pression artérielle, son contrôle est essentiellement dirigé par les reins. Dans certaines circonstances, ces systèmes sont altérés et rendent inefficace le travail des reins. À long terme, en réponse à l'élévation chronique de la pression artérielle, un remodelage vasculaire s'établit. Cette adaptation, ou plutôt maladaptation, prend place afin de normaliser la tension pariétale qui devient trop importante suite à l'augmentation de la pression artérielle. Cette reconfiguration de la structure vasculaire contribuerait à maintenir la pression artérielle élevée et de la même manière, le remodelage des petites artères de résistance favoriserait le dommage des organes cibles en altérant leur apport sanguin⁸.

Au cours des dernières années, des efforts considérables ont été initiés afin de mieux saisir l'impact clinique du remodelage vasculaire et sa contribution dans le développement de l'hypertension artérielle. Chez des patients atteints d'hypertension essentielle, on observe que la réserve coronaire est inversement proportionnelle au rapport média-lumière des petites artères de résistance⁸. Ceci représente une évidence directe que le remodelage vasculaire réduit significativement la capacité maximale vasodilatatrice coronaire. En d'autres termes, la fonction vasculaire coronaire des patients atteints d'hypertension artérielle devient altérée. Il est aussi suggéré qu'une correction du remodelage vasculaire contribue à l'effet thérapeutique de certains antihypertenseurs^{9, 10}. Au-delà de la baisse de la pression artérielle, la protection de la structure et de la fonction vasculaire préviendrait davantage l'apparition d'AVC, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance rénale, tous associés à l'hypertension artérielle. Cette hypothèse constitue un élément de plus en plus important dans la compréhension

de l'hypertension artérielle. En ce sens, l'étude "Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension" (Life) a permis, au-delà du contrôle de la pression artérielle, de démontrer l'impact associé à certains antihypertenseurs. Cette importante étude clinique suggère que les antagonistes des récepteurs AT_1 (ARAs), au-delà de leur action sur la pression artérielle, en comparaison à d'autres thérapies antihypertensives, possèdent des avantages supplémentaires¹¹. Les ARAs réduisent la pression artérielle de façon similaire à l'action des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques. Toutefois, les ARAs préviennent davantage la morbidité et la mortalité cardiovasculaires. De plus, une sous-étude du projet LIFE a démontré que le remodelage cardiovasculaire, observé chez des patients atteints d'hypertension artérielle depuis plusieurs années, influence de façon négative leur capacité fonctionnelle¹². Ceci représente une autre preuve de l'importance d'intervenir au-delà de la pression artérielle dans le traitement de cette pathologie.

À ce jour, il ne fait aucun doute que le remodelage vasculaire est lourd de conséquences dans le développement de l'hypertension artérielle. La poursuite de cet axe de recherche est essentielle, car elle permettra de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux changements de la structure vasculaire, mais aussi de déterminer des cibles thérapeutiques davantage sélectives afin de prévenir et même régresser le remodelage vasculaire associé à l'hypertension artérielle. Depuis la découverte du rôle fonctionnel de l'endothélium¹³, de nombreux travaux ont été entrepris et ont permis d'approfondir notre compréhension concernant cette structure vasculaire qui est hautement impliquée dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire^{14, 15}. L'endothélium produit une panoplie de médiateurs qui modulent la croissance cellulaire de la paroi vasculaire^{16, 17}. Au nombre des médiateurs endothéliaux, l'endothéline (ET) représenterait un acteur de premier plan dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire^{18, 19}. À l'intérieur de cette thèse de doctorat, nous avons cherché à mieux définir le rôle de l'ET dans le remodelage vasculaire hypertrophique. Afin de bien saisir l'importance et le rôle central que l'ET semblerait occuper dans ce phénomène physiopathologique, une revue exhaustive de différents aspects reliés à l'homéostasie du système vasculaire sera présentée. Un survol concernant les facteurs impliqués dans le contrôle de la pression artérielle, et le développement de l'hypertension artérielle sera effectué. Les changements de la

structure vasculaire pouvant s'établir dans l'hypertension artérielle et en présence de conditions diverses seront abordés. Finalement, les événements cellulaires impliqués dans l'action du système rénine-angiotensine (SRA) et de l'ET seront discutés et permettront de mettre en évidence la démarche scientifique intégrative qui a été utilisée afin de réaliser cette thèse.

1.2 L'HOMÉOSTASIE DU SYSTÈME VASCULAIRE

1.2.1 Aperçu du système vasculaire

Le système vasculaire se compose d'un nombre important de vaisseaux sanguins qui contribuent de façon synergique à la circulation du sang à travers notre organisme. Sans ce réseau d'artères, veines et capillaires les fonctions d'approvisionnements en oxygène et en nutriments ainsi que l'évacuation de déchets cellulaires et métaboliques ne seraient pas effectuées. En bref, le système vasculaire est primordial à l'homéostasie du corps humain. Au moment de la contraction ventriculaire gauche, le sang quitte le cœur et se dirige vers la périphérie par l'entremise des vaisseaux du système artériel que l'on identifie comme les artères de conductance (Figure 1.1). Comme sa terminologie l'indique, ces artères permettent au sang d'être conduit aux différentes parties de notre organisme. Par la suite, des artères de plus petit calibre ont la tâche de contrôler la pression avec laquelle le sang est acheminé aux nombreuses cellules. Ces vaisseaux, identifiés par le terme artères de résistance, deviennent de plus en plus petits lorsqu'ils s'atteignent la périphérie. Leur lumière est d'un diamètre de plus en plus faible, leurs parois plus minces et ils se composent essentiellement de cellules musculaires lisses. Ils possèdent une arborisation très développée, ce qui permet d'atteindre spécifiquement chaque cellule composant les tissus et les organes de notre corps. Finalement, par l'action des artères de conductance et de résistance, un débit sanguin continu et lent atteint les capillaires sanguins qui représentent les plus petits vaisseaux du système vasculaire. C'est au niveau de ces derniers que l'oxygène et les nutriments sont échangés aux cellules.

Afin d'évacuer les déchets métaboliques, le sang revient au cœur par le réseau veineux. Similairement au réseau artériel, des capillaires sanguins récupèrent les déchets métaboliques et rejoignent la circulation veineuse. Le réseau veineux se compose de vaisseaux de petits calibres appelés veinules (Figure 1.1). Au long du trajet qui reconduit le sang vers le cœur, le calibre des veinules augmente pour devenir les veines (Figure 1.1). Par la suite, elles atteignent la veine majeure de l'organisme, la veine cave, pour finalement se déverser dans l'oreillette droite du cœur. Ces vaisseaux possèdent une caractéristique fonctionnelle commune. La pression sanguine se retrouvant à l'intérieur des veines est très basse et varie très peu. Il y a donc des adaptations fonctionnelles qui contribuent au retour du sang veineux vers le cœur. Bien que l'action des muscles respiratoires contribue au retour veineux, l'action des muscles squelettiques est assurément le plus important mécanisme. Les contractions et les relâchements des muscles squelettiques entourant les veines propulsent le sang vers le cœur. De plus, les valvules se trouvant à l'intérieur des veines empêchent le reflux, permettant au sang de continuer sa route vers le cœur. Le sang est alors pompé par le ventricule droit et il est dirigé vers les poumons par l'artère pulmonaire où le gaz carbonique (CO_2) est expulsé de l'organisme. De même, l'oxygène (O_2) capté par le système pulmonaire est acheminé par les veines pulmonaires au ventricule gauche afin d'être dirigé en périphérie.

1.2.2 La structure histologique de l'arbre artériel

Les vaisseaux qui composent l'arbre artériel sont constitués des trois mêmes couches histologiques. De la lumière vasculaire en se dirigeant vers l'extérieur du vaisseau, la paroi se compose de l'intima, de la média et de l'adventice (Figure 1.2).

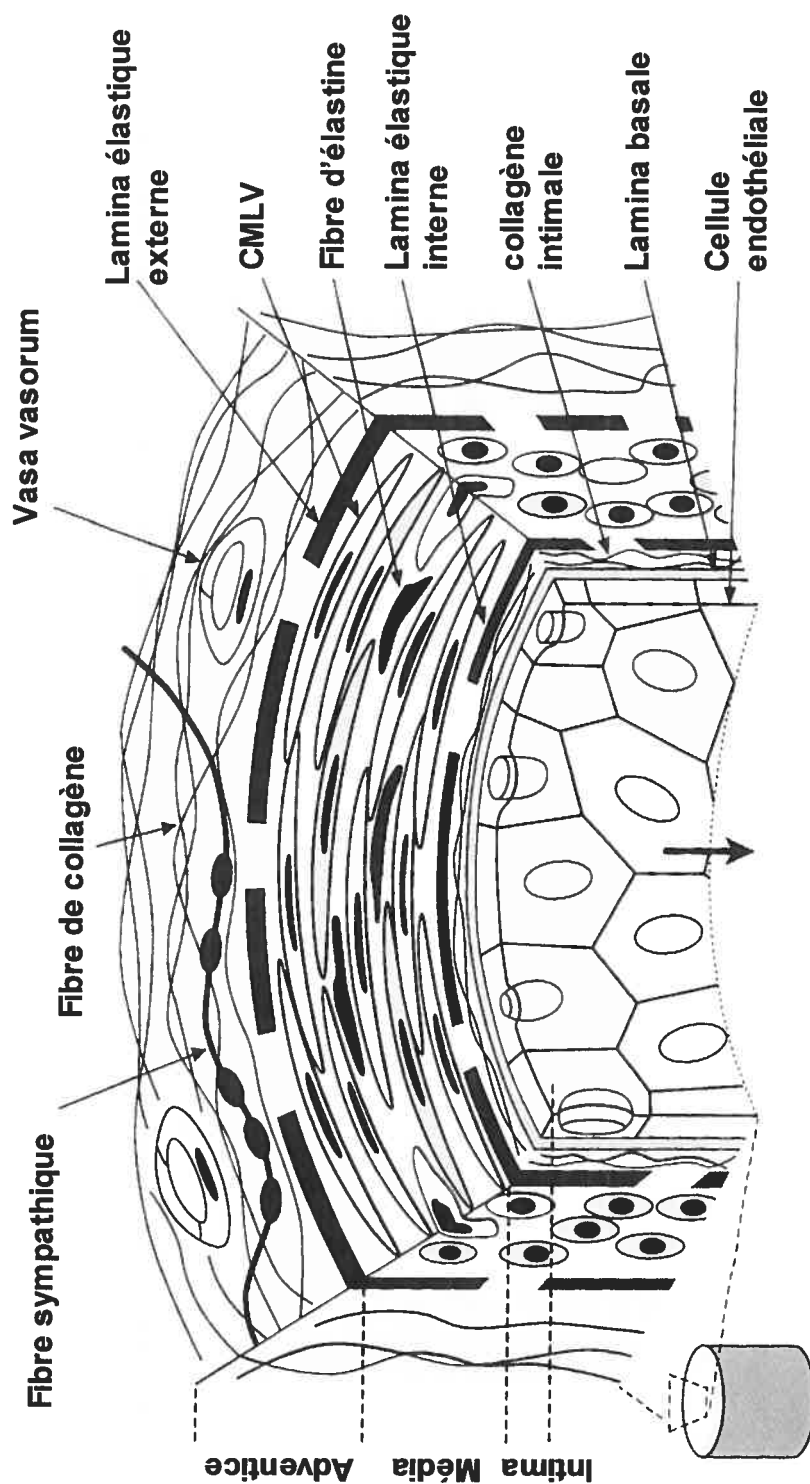


Figure 1.1 Structure de la paroi artérielle

(Adapté de Levick, J.R. et al. *An Introduction to Cardiovascular Physiology*, 2003)

L'intima

L'intima représente la couche vasculaire la plus mince. Elle est essentiellement composée d'une monocouche de cellules endothéliales que l'on désigne par le terme endothélium. Néanmoins, une matrice extracellulaire ainsi que quelques cellules musculaires lisses sont présentes à l'intérieur de cette tunique²⁰. Afin d'accorder de la flexibilité et de la stabilité à l'intima, la lamelle élastique interne, une couche de tissu élastique et fibreux, se retrouve à la base de l'intima²¹ (Figure 1.2). L'endothélium qui est la structure prédominante de l'intima forme une barrière entre la lumière du vaisseau et la portion basolatérale. Dépendamment du territoire vasculaire, l'endothélium devient plus ou moins perméable aux cellules, aux macromolécules, aux nutriments organiques, aux sels inorganiques et à l'eau²². Ainsi, les cellules endothéliales formant la couche interne des artères cérébrales adoptent une conformation très serrée, ne permettant qu'à l'eau de diffuser passivement. Dans le but d'assurer le passage transmembranaire, un certain nombre de transporteurs et co-transporteurs s'intègrent à la membrane plasmique des cellules endothéliales et permettent le passage de petites molécules comme le glucose, le sodium, le chlore et le potassium entre le territoire vasculaire et les cellules nerveuses composant le cerveau²². L'endothélium constitue donc une barrière qui par de nombreux mécanismes permet les échanges entre la lumière vasculaire et le compartiment interstitiel.

Pendant longtemps, l'endothélium a été perçu comme un filtre passif. Ce n'est qu'au cours des vingt dernières années que l'endothélium s'est révélé être une structure pourvue d'une grande complexité sur le plan fonctionnel. Au-delà de ses fonctions de transporteurs sélectifs, l'endothélium possède un rôle dans l'homéostasie du système vasculaire¹⁴. Elle contribue à l'hémostase, à la régulation du tonus vasculaire, à la régulation de la croissance de la paroi vasculaire ainsi qu'à la réponse inflammatoire de cette dernière²³. Le fonctionnement de l'endothélium est dynamique et peut devenir dysfonctionnel lorsqu'une condition physiopathologique l'atteint. En bref, les cellules endothéliales sont le site de production de nombreux médiateurs comme le monoxyde d'azote (NO), les dérivés prostanoïdes, l'ET, la thrombomoduline et l'activateur du plasminogène¹⁴. Les médiateurs produits par l'endothélium sont en équilibre en condition

physiologique. Cette stabilité favorise l'activité antithrombotique sans toutefois empêcher l'action procoagulante lors d'une atteinte de la couche endothéliale. De la même manière, les médiateurs endothéliaux vasodilatateurs, comme le NO et les prostaglandines, sont essentiels au maintien du tonus vasculaire²². Dans de nombreux états pathologiques, comme l'athérosclérose et l'hypertension, il y a une dysfonction endothéliale qui se manifeste par une perte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium²⁴. Sans définir davantage les rôles de l'endothélium, car ce sujet sera abordé plus tard au cours de cette thèse, il est important de bien comprendre que cette structure possède un rôle de premier plan dans la réactivité vasculaire ainsi que dans le maintien de la structure des vaisseaux artériels.

La média

La média qui se retrouve sous l'intima forme la plus grande portion de la paroi artérielle (Figure 1.2). Au niveau des artères de résistance, la paroi vasculaire est constituée à 70% de cellules musculaires lisses (CMLVs) provenant de la média²⁵. Néanmoins, elle comprend une matrice extracellulaire qui se compose de plusieurs éléments dont les principaux sont des fibres d'élastine, des fibres de fibronectine et des fibres de collagène²⁶. Bien que les CMLVs forment de façon substantielle la tunique médiale des artères de résistance, les éléments de la matrice extracellulaire peuvent devenir importants en conditions physiopathologiques. Certaines composantes cellulaires comme le collagène et les intégrines contribuent au remodelage des artères de résistance et ils influencent à leur tour les propriétés mécaniques de ces artères²⁶. En situation physiologique, les CMLVs des artères de résistance confèrent à la média la qualité de se contracter et de se dilater en réponse à une variété de facteurs d'origine endothéliale et/ou neurohumorale²⁷. Les CMLVs composant la média représentent donc les acteurs principaux du contrôle du mouvement de volume sanguin à l'intérieur du réseau artériel de résistance. Au niveau des artères de conductance, les CMLVs possèdent aussi un rôle prépondérant dans le contrôle de la perfusion artérielle, toutefois la contribution des éléments de la matrice extracellulaire sécrétée par les CMLVs est encore plus importante à la structure et à la fonction de ces artères²⁸. L'élastine constitue la protéine principale

de la matrice extracellulaire. Chacune des lamelles d'élastine s'imbrique en alternance avec les CMLVs, accordant à la paroi vasculaire la propriété d'absorber l'action hémodynamique lors de l'éjection systolique. De la même manière, sa structure lui confère la capacité de maintenir un débit sanguin uniforme lors de la diastole. La distribution des CMLVs et du tissu matriciel est d'environ 50-50% dans la tunique médiale des artères de conductance²⁵. Contrairement aux artères de résistance, les propriétés mécaniques des artères de conductance sont davantage influencées par la matrice extra-cellulaire²⁹. La tunique médiale est finalement consolidée à ses extrémités par deux couches de tissus élastiques. Une première, la lamelle élastique interne qui se lie à l'intima et la seconde, la lamelle élastique externe qui se lie à l'adventice. Cette deuxième couche de tissus élastiques est généralement plus mince que la lamelle élastique interne et même absente dans les artères de résistance (Figure 1.2).

L'adventice

La tunique cellulaire la plus externe de la paroi du vaisseau artériel est appelée l'adventice (Figure 1.2). Elle est principalement composée de tissus fibreux et élastiques. De plus, un réseau de tissus nerveux, de vaisseaux lymphatiques et de petites artères appelées aussi *vasa vasorum* se logent dans l'adventice des artères de conductance afin de maintenir leur homéostasie²¹. Comme il sera discuté dans la section suivante, la paroi des artères de conductance est très épaisse, la présence du *vasa vasorum* et des vaisseaux lymphatiques assurent l'acheminement de l'oxygène et des nutriments, de même que l'évacuation de déchets métaboliques et l'équilibre hydrique qui sont des fonctions essentielles au bon fonctionnement vasculaire³⁰.

Au cours des dernières années, des évidences expérimentales ont permis d'établir une contribution fonctionnelle à cette couche de la paroi vasculaire. Jusqu'à tout récemment, l'adventice était perçue comme une structure de support possédant très peu de rôle physiologique³¹. Toutefois, en présence de conditions pathologiques, où la fonction vasculaire est altérée, des changements structuraux et biochimiques sont observés dans l'adventice³¹. Bien qu'encore peu de choses soit connu quant à son rôle dans la fonction

vasculaire, il semble que des médiateurs tel le NO serait produit à ce niveau et pourrait contribuer à la régulation du tonus vasculaire^{32, 33}. Ainsi, l'exploration du rôle fonctionnel de l'adventice se doit d'être poursuivi, car ceci accorderait de nouveaux outils afin de contrer le développement et les conséquences associées à l'athérosclérose, l'hypertension et tous autres problèmes vasculaires.

1.2.3 La structure et le rôle des artères de conductance

Les artères élastiques

Les artères de conductance représentent les vaisseaux les plus importants en termes de diamètre. Chez l'être humain, le diamètre de l'aorte varie entre 1 et 2 cm et il constitue le plus gros vaisseau de l'organisme. Les carotides comme l'aorte sont classifiées comme des artères de conductance élastiques. Grâce à l'importante lumière ainsi que par leur structure composée de CMLVs et de tissus matriciels, ces artères conduisent le sang en direction des nombreux tissus et organes. De plus, les propriétés viscoélastiques qui caractérisent de façon importante ces artères permettent d'amortir l'onde systolique de pression induit lors de l'éjection du sang en provenance du cœur³⁴. C'est davantage la tunique médiale qui possède les propriétés élastiques, essentielles au fonctionnement mécanique de la paroi vasculaire. La média est composée d'un type cellulaire, la CMLV qui est soutenue par une matrice extra-cellulaire, composée d'élastine, de collagène et de protéoglycanes²⁹.

L'élastine représente 25% de l'aorte thoracique et c'est elle qui lui accorde sa grande compliance. Le collagène, une autre protéine extracellulaire contrebalance en quelque sorte l'action de l'élastine. Il constitue 35% du volume de la tunique médiale. Les fibres de collagène sont très peu extensibles, toutefois ces fibres se présentent sous la forme d'un réseau de fibrilles qui confère au collagène une certaine flexibilité. Le rôle physiologique du collagène est de résister aux forces de tractions et, de cette façon, elles empêchent l'étirement excessif de la paroi vasculaire³⁵. Comme il sera discuté à l'intérieur de cette thèse, en situation pathologique, ces artères de conductance peuvent perdre leur élasticité qui prédomine à l'état physiologique, en faveur d'une plus grande

rigidité. Ceci peut s'expliquer par une diminution du rapport élastine/collagène, toutefois, sans élaborer davantage cet aspect, d'autres mécanismes peuvent contribuer à la rigidité des artères élastiques^{36,37}.

De façon fonctionnelle, les artères de conductance, telle l'aorte et les carotides possèdent la qualité de se distendre au moment où l'éjection systolique propulse le sang hors du ventricule gauche. Au moment de l'éjection systolique, 50% du volume sanguin est projeté dans la circulation périphérique. Toutefois, la portion restante est conservée dans le territoire vasculaire conducteur grâce à la grande propriété élastique de ce territoire artériel. Au moment de la phase diastolique, la valve aortique se referme et la pression aortique chute tranquillement. Cette chute de pression confère à l'aorte la capacité de reprendre son diamètre initial et de la même manière d'induire une force sur le volume sanguin qu'il contient. Ceci permet alors l'écoulement du volume sanguin restant vers la périphérie. Ainsi, cette fonction de tamponnement de l'éjection systolique et d'écoulement continu qui en succède est appelée la fonction de Windkessel^{38, 39}. C'est Weber, en 1827, qui explique l'action des artères de conductance en utilisant un réservoir d'eau auquel un volume d'air remplit la portion supérieure. La compression de l'air emprisonné dans la portion supérieure du réservoir transforme l'entrée intermittente d'eau dans le réservoir en un débit de sortie bien constant. Cette fonction spécifique aux artères de conductance contribue à la transformation du débit artériel pulsatif en un débit lent et continu au niveau des artères de la périphérie.

Les artères musculaires

Progressivement, lorsque l'on atteint la périphérie, le contenu en fibres élastiques chute dans la paroi vasculaire⁴⁰. En ce sens, les artères de conductance davantage périphériques possèdent une tunique média plus épaisse, proportionnellement à la lumière vasculaire qui s'explique par un nombre plus important de CMLVs. Néanmoins, ces artères contiennent un certain pourcentage de fibres élastiques qui leur accordent une bonne flexibilité⁴¹. Ces artères de conductance sont appelées les artères musculaires et l'artère fémorale constitue un exemple de ce type artériel. Leur principale fonction est de

distribuer rapidement le sang aux organes et tissus de l'organisme²¹. Chez l'être humain, elles possèdent un diamètre variant entre 0,1 et 1cm. En dépit de leur caractéristique structurale préférentiellement composée de CMLVs, les artères musculaires possèdent une grande capacité contractile. Ceci leur assure de bien conduire le sang aux nombreux organes et muscles de la périphérie sans être affectées par les mouvements de flexions de nos membres. Finalement, l'adventice est hautement innervée par les fibres du système nerveux adrénergiques qui contribuent au contrôle vasomoteur de ces artères^{42, 43}. La qualité musculaire de ces artères et l'action du système sympathique participent à la distribution du sang. En situation d'exercice aérobie, une dilatation dépendante de l'endothélium, des artères musculaires, de la zone impliquée dans l'effort, contribuera à bien approvisionner les muscles recrutés par l'exercice^{42, 44, 45}. De même, en présence d'un trauma sévère impliquant une artère musculaire, une vasoconstriction est induite afin de limiter l'hémorragie qui pourrait être mortelle.⁴³

1.2.4 L'importance des artères de résistance

La localisation des artères de résistance

Au cours des dernières décennies, un nombre important d'études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées afin de comprendre le rôle des artères possédant un diamètre oscillant entre 100 et 300 μm dans la distribution du débit sanguin^{46, 47}. Ainsi, les artères comprises dans cet intervalle sont généralement identifiées aux artères chargées du contrôle de la résistance périphérique vasculaire⁴⁶. Elles induisent une résistance substantielle au débit sanguin en situation de repos, et de la même manière, ces artères contribuent à ce contrôle lorsque les demandes métaboliques sont altérées. Bien qu'un nombre important de travaux aient été publiés à partir de données sur les artères mésentériques, il demeure que le contrôle de la résistance périphérique vasculaire n'est pas distribué également à travers l'organisme entier. Entre les territoires vasculaires localisés aux muscles squelettiques, les intestins et le cerveau, la régulation de la pression artérielle est modulée différemment, impliquant que l'association diamètre

artériel et contrôle de la résistance périphérique vasculaire est spécifique à l'organe visé⁴⁸. De plus, la localisation des artères de résistance a été majoritairement étudiée chez des petits animaux⁴⁶, peu d'études ont été faites sur des animaux plus gros et même chez l'homme. De plus, une grande majorité de ces observations ont été obtenues sous anesthésie ce qui n'est pas exactement représentatif de l'état physiologique de l'animal éveillé⁴⁷. Néanmoins, il demeure que les résultats rapportés, concernant la localisation des artères responsables du contrôle de la résistance périphérique vasculaire, dans des modèles animaux concordent avec les données suggérant qu'un dysfonctionnement des artères de résistance, possédant un diamètre inférieur à 300 μm , est directement relié au développement de l'hypertension artérielle⁴⁶. Ceci supporte donc l'idée que la pression artérielle commence généralement à chuter de façon majeure à un diamètre vasculaire de 300 μm et atteint un niveau minimal de pression dans le territoire artériolaire (10 et 100 μm)⁴⁹. C'est pour l'instant la meilleure preuve de l'étendue du territoire artériel (Figure 1.2).

La structure des artères de résistance

Les artères de résistance peuvent être distribuées en deux classes. Il y a les artères de résistance proximales, appelées aussi "feed artery"⁵⁰. Ces dernières possèdent un diamètre variant entre 100 et 500 μm . Elles se retrouvent libres, c'est-à-dire sans encrage aux tissus souvent désigné par le terme parenchyme tissulaire. La deuxième classe d'artères de résistance comprend le réseau artériolaire (10 à 100 μm) qui s'enchevêtre dans le parenchyme tissulaire⁵⁰. Contrairement aux artères de conductance, peu de fibres élastiques et de tissus fibreux se retrouvent dans la paroi des artères de résistances. Essentiellement, la paroi vasculaire des artères de résistance est formée de CMLVs⁴¹. De plus, similairement aux artères de conductance, la portion interne des artères de résistance qui est en étroit contact avec la lumière du vaisseau se compose d'une monocouche de cellules endothéliales⁴¹.

Le rôle des artères de résistance

Les artères de résistance sont primordiales au contrôle de la pression artérielle. Le graphique élaboré par Davis et coll (Figure 1.2) expose très bien la chute importante de la pression artérielle moyenne au niveau des artères de résistance⁴⁹. Plusieurs facteurs contribuent au bon fonctionnement du territoire artériel de résistance. Il y a les cellules endothéliales qui composent l'endothélium et qui produisent et libèrent de nombreuses substances vasoactives importantes à la régulation de la pression artérielle moyenne^{51, 52}. Le système sympathique participe aussi à ce contrôle^{46, 53}. Proportionnellement à la lumière vasculaire, la structure médiale des artères de résistance proximales est plus importante et est formée davantage de CMLVs, expliquant à ce niveau la grande innervation sympathique⁴³. Toutefois, de façon progressive, lorsqu'on atteint le territoire artériolaire (10 à 100 μm), la paroi devient de plus en plus mince. Les vaisseaux artériels sont alors composés d'un nombre moins important de cellules musculaires lisses ainsi que d'une lumière vasculaire moins grande⁴³. Les artères formant la microcirculation sont enchevêtrées dans les tissus environnants, expliquant l'influence majeure des médiateurs locaux dans la régulation du débit sanguin des artérioles distales^{42, 54}.

Par leur contrôle adéquat de la perfusion, les artères de résistances sont essentielles au bon fonctionnement des organes et des muscles qui composent notre organisme. Tout au long de l'arbre artériel, la pression pulsative induite lors de l'éjection systolique est atténuée et le débit sanguin devient lent et continu. Dans un premier temps, comme il a été expliqué, l'élasticité des artères de conductance contribue à l'élimination du débit pulsatif. Dans un deuxième temps, les artères de résistance, par leur contrôle vasomoteur, participent aussi au maintien uniforme du débit sanguin. Cet effet conjoint des artères de conductance et de résistance est primordial car il protège le réseau de petits vaisseaux appelés les capillaires. Sans cette action synergique, ces petits vaisseaux qui sont constitués d'une paroi très mince s'endommageraient, favorisant alors une extravasation du compartiment sanguin.

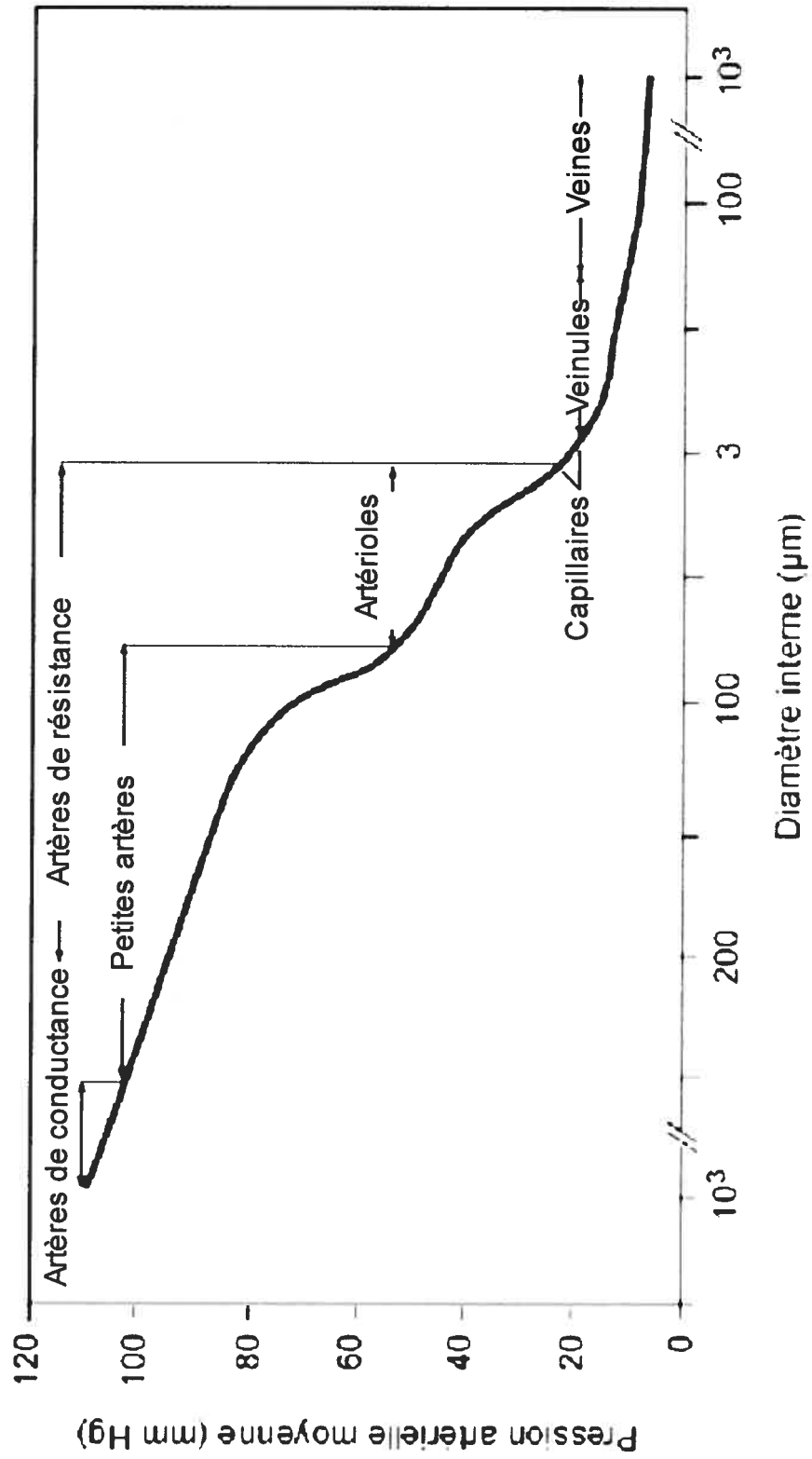


Figure 1.2 Chute de la pression artérielle moyenne à l'intérieur du système vasculaire
(Adapté de Davis, M.J. et al. *Am J Physiol* 250: H291, 1986)

1.2.5 La régulation de la pression artérielle

La complexité du contrôle de la pression artérielle moyenne

De manière générale, l'hypertension artérielle se définit comme une élévation de la pression intra-artérielle. Cet effet est lié à une augmentation de la résistance périphérique totale qui est associée au diamètre interne des artérioles et des artères de résistance⁵⁵. La pression artérielle moyenne (PAM) qui correspond à l'équation suivante: $PAD + 1/3(PAS-PAD)^{56}$, constitue un indice de l'état de la résistance périphérique. De plus, une élévation supranormale de cette valeur est associée à une hypertension artérielle systolodiastolique⁵⁵. La résistance périphérique est généralement à l'origine du développement de l'hypertension artérielle. Toutefois, un deuxième facteur physiologique, le débit cardiaque, module aussi directement la PAM. De plus, outre ces deux facteurs physiologiques, plusieurs autres facteurs physiologiques et physiques collaborent à la régulation de la PAM^{57,58} (Figure 1.3).

Bien que le débit cardiaque soit essentiel à la régulation de la PAM, la résistance périphérique joue un rôle majeur dans le maintien de ce paramètre hémodynamique. Ce deuxième facteur est particulièrement important à comprendre dans le contexte de l'hypertension artérielle. Comme il a été expliqué précédemment, la PAM est largement contrôlée par les petites artères de résistance et les artérioles. Plusieurs mécanismes sont responsables de la vasoréactivité des petites artères de résistance. Les catécholamines provenant des fibres sympathiques et des glandes médullo-surrénales ainsi que l'angiotensine II contribuent au maintien de la résistance périphérique. Il y a aussi des facteurs locaux, tels les métabolites (O_2 , K^+ , CO_2 , H^+ , adénosine), la réponse myogénique et les facteurs d'origine endothéliale qui contribuent à cette régulation. La viscosité du sang qui est dépendante de l'hématocrite, influence aussi la PAM. Néanmoins, celle-ci reste généralement fixe.

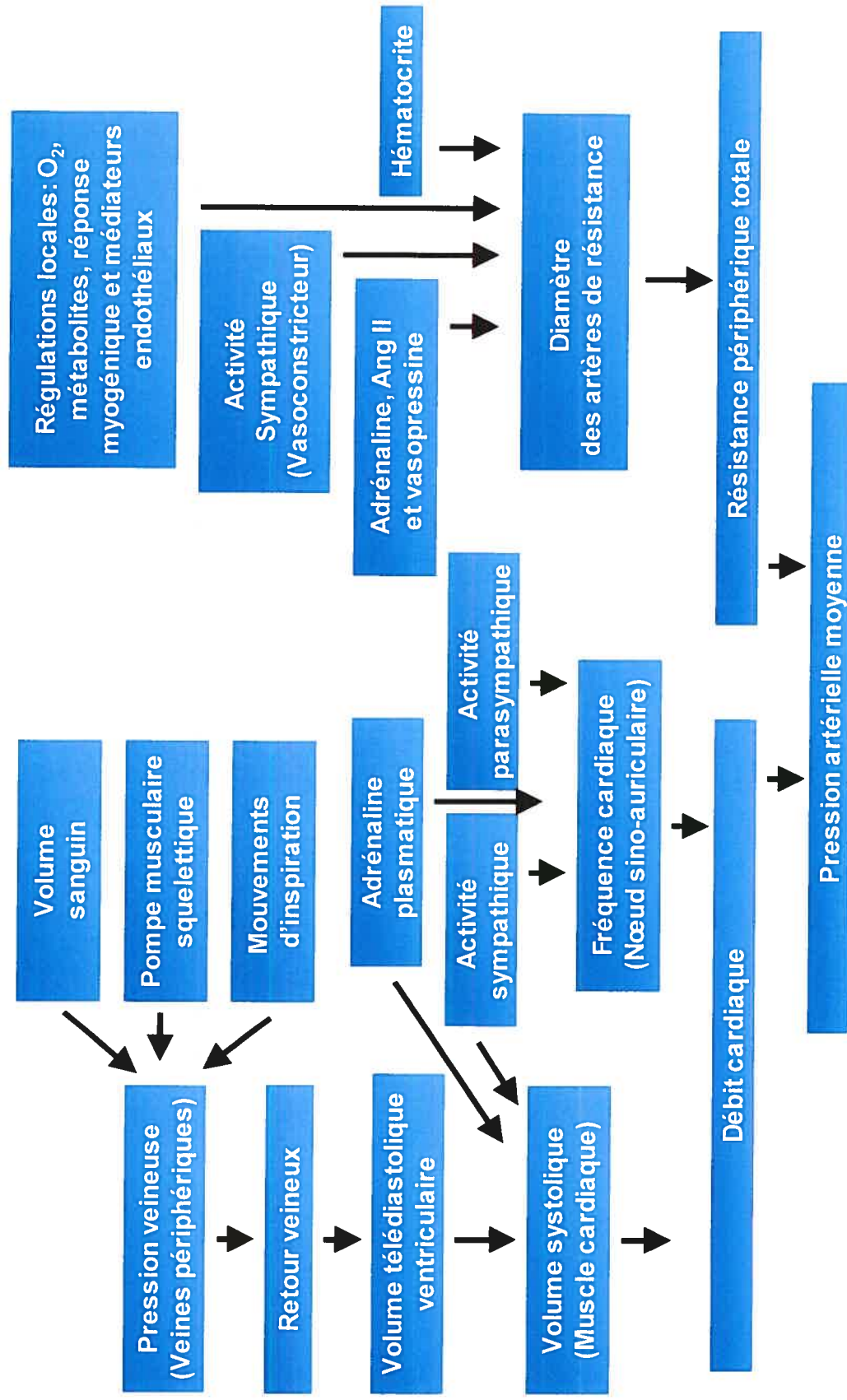


Figure 1.3 Les facteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle moyenne

Les facteurs influençant la composante systolique

La pression artérielle systolique (PAS) correspond à la pression produite lors de l'éjection du sang hors du ventricule gauche au cours de sa phase de contraction. Elle constitue un paramètre hémodynamique qui est dépendant de la performance cardiaque, de la rigidité des artères de conductance ainsi que de la résistance périphérique⁵⁹. Bien que la fonction du cœur puisse être altérée par différentes pathologies cardiaques, elle s'avère relativement stable tout au long de la vie⁶⁰. Le compartiment vasculaire représente donc le facteur déterminant de la pression systolique en condition physiologique. Les artères de conductance, telle l'aorte et les carotides remplissent une fonction de conduction. De plus, par leurs propriétés élastiques, elles jouent un rôle primordial dans l'amortissement de l'onde systolique de pression. Comme il a été expliqué plus tôt, l'aorte contribue à la transformation du débit pulsatif à la sortie du cœur en un débit continu au niveau des capillaires. Avec le vieillissement, l'élasticité de ces artères chute de façon progressive et de façon marquante lorsqu'un âge avancé est atteint⁶¹. Vers l'âge de soixante-quinze ans, les hommes et les femmes sédentaires souffrants d'aucune pathologie cardiovasculaire présentent une diminution de la compliance carotidienne d'environ 40 à 50%^{62, 63}. Ce sont des modifications de la structure de ces artères qui sont responsables de la modulation de leurs propriétés viscoélastiques⁶¹. Ces modifications structurales consistent principalement en une destruction des éléments élastiques de la paroi. Une calcification et une fragmentation des lamelles élastiques se créent. Une augmentation du ratio collagène/élastine est aussi observée et s'explique par une plus grande synthèse de collagène et une diminution de l'élastine. La présence de protéines glyquées contribue également à la rigidité de la paroi aortique. D'autres changements, comme une hypertrophie des CMLVs et une présence accrue de molécules d'adhésions peuvent participer à l'augmentation de la rigidité de la paroi de ces artères. Ces changements produisent une élévation de la PAS et avec le temps entraîne le développement d'une condition pathologique que l'on appelle l'hypertension artérielle systolique isolée (HSI).

La résistance périphérique influence aussi la PAS^{64, 65}. Une augmentation de la résistance périphérique découlant d'une constriction ou d'un remodelage des artères de résistance

contribue à l'élévation de la pression systolique et ainsi au développement de l'hypertension artérielle, isolée à la systole ou accompagnée d'une élévation diastolique. En effet, les artéioles constituent un site important de réflexion de l'onde de pouls. Cette onde de propagation systolique parvient au territoire formant les artères de résistance et est réfléchi plus rapidement lorsque les artéioles se retrouvent dans un état où leur résistance périphérique est augmentée. L'onde de réflexion rejoint la portion proximale de l'aorte plus tôt, au début de la phase systolique et, ainsi élève la pression artérielle produite au cours de cette même phase.

Les facteurs influençant la composante diastolique

La pression artérielle diastolique (PAD) est définie comme la pression artérielle lors de la période de relaxation cardiaque. Pendant longtemps on a affirmé que la PAD correspondait à une mesure de la résistance périphérique⁵⁵. Au cours de la phase diastolique, le sang s'écoule tout au long des artères de conductance afin d'atteindre les artères de résistance. Ces dernières qui sont des vaisseaux de petits calibres ($< 300 \mu\text{m}$) contribuent substantiellement au contrôle de la PAM. En présence d'un état vasoconstricte ou d'un remodelage vasculaire limitant le diamètre de la lumière vasculaire, la résistance périphérique s'accroît et l'écoulement de sang à l'intérieur des artères de résistance devient restreint, expliquant l'élévation de la PAM et de la PAD^{59, 64}. Toutefois, il est bien établi aujourd'hui que la PAD ne constitue pas une mesure exacte de l'état de la résistance périphérique⁵⁵. Ce facteur hémodynamique est modulé en fonction des variations de la résistance périphérique, mais il est aussi influencé par la rigidité des grosses artères de conductances. La contribution relative de l'état des artères de conductance et des artères de résistance détermine la PAD⁵⁵. Ainsi, il est faux de croire qu'une plus grande résistance périphérique engendre inévitablement une augmentation de la PAD. Au contraire, il est possible en présence d'une PAS élevée, qu'une baisse importante de la PAD soit observable bien que la résistance périphérique soit grande⁵⁵. Au même titre que la résistance périphérique, la compliance des artères de conductance représente un facteur déterminant au contrôle de la PAD, particulièrement chez les personnes âgées.

Lors du développement de l'HSI, la structure de l'aorte se rigidifie et la PAD devient altérée ce qui affecte négativement la perfusion cardiaque⁶⁶. L'onde systolique de pression n'est pas bien amortie lorsque les artères de conductance deviennent plus rigides. La vitesse de l'onde de pouls devient plus rapide à l'intérieur de l'arbre artériel et l'onde est réfléchiée plus rapidement et atteint la portion proximale de l'aorte thoracique au cours de la phase systolique plutôt qu'au début de la phase diastolique⁶⁷. Dans cette condition, la PAS s'élève de façon anormale en raison du retour précoce de l'onde de réflexion. De plus, la composante diastolique chute sous sa valeur normale, car la pression artérielle lors de la phase diastolique n'est plus amplifiée par l'onde de réflexion,⁶⁸. Ce phénomène caractérise l'état cardiovasculaire des personnes âgées, et cet état est encore plus marquant chez les patients âgés atteints d'HSI. Une chute de la pression artérielle diastolique a des répercussions importantes sur la perfusion coronaire. Ces artères qui assurent l'irrigation cardiaque sont préférentiellement perfusées lors de la phase diastolique. Une chute de la PAD altère la perfusion du cœur et favorise l'apparition de périodes ischémiques pouvant résulter en un infarctus du myocarde⁶⁹. La sélectivité systolique dans le traitement pharmacologique de l'HSI constitue un facteur qui préoccupe plusieurs équipes de recherche. La PAD de ces patients est souvent détériorée et généralement l'administration d'agents antihypertenseurs vasodilatateurs représente l'intervention pharmacologique priorisée dans cette situation. Toutefois, dans certains cas une chute de la résistance périphérique peut affecter davantage la PAD et conséquemment la perfusion coronaire^{69, 70}. Une intervention pharmacologique ciblée à la PAS, par une amélioration des propriétés visco-élastiques de l'aorte, n'altérerait pas la PAD, de sorte que la perfusion des coronaires resterait adéquate.

Quelle composante de la pression artérielle est la plus importante ?

Pendant longtemps on a considéré que le contrôle de la PAD constituait la composante de la pression artérielle à surveiller dans l'intervention associée au traitement de l'hypertension artérielle et la prévention du développement de problèmes cardiovasculaires^{71, 72}. L'origine de ce paradigme paraît obscure, mais semble relié au

début du XXe siècle⁷³. L'hypertension artérielle était alors définie comme une augmentation de la pression intra-artérielle, secondaire à une augmentation de la résistance périphérique totale. Cliniquement, une élévation significative de la PAM et de la PAD permettait d'identifier ce phénomène physiopathologique⁵⁵.

Ce n'est qu'au début des années 1970, suite à la publication de l'étude de Framingham qu'une plus grande importance fut progressivement accordée à la PAS comme facteur de risques cardiovasculaires⁷³. À la suite de cette étude, cliniciens et chercheurs se sont davantage intéressés à la PAS et un nombre non-négligeable de travaux ont été publiés^{74, 75}, permettant d'appuyer l'hypothèse voulant que l'importance de la PAS soit égale, sinon supérieure à celle de la PAD⁷³. Plus récemment, l'importance d'un troisième paramètre hémodynamique a captivé l'intérêt de la communauté médicale et scientifique. Ce dernier constitue la pression pulsée (PP) et il correspond à la différence entre la PAS et la PAD. Il semble que chez les patients âgés (> 60 ans), où la PAS est élevée et que la PAD est abaissée significativement, le risque de développement de pathologies cardiovasculaires devient très important. Ceci suggère qu'une élévation substantielle de la PP s'ajoute à l'impact d'une PAS plus grande et représente un risque majeur associé au développement de problèmes cardiovasculaires^{76, 77}.

Des preuves bien établies appuient autant la PAD, la PAS et la PP comme facteur de risques du développement de pathologies cardiovasculaires. Ces résultats démontrent un manque de convergence et suggèrent le questionnement suivant: Est-il possible de trancher en faveur d'un de ces trois paramètres hémodynamiques ? Aujourd'hui, il est établi que la PAS constitue le facteur hémodynamique le plus important à surveiller chez la grande majorité des patients atteints d'hypertension artérielle⁷⁸. Néanmoins, au cours de la vie, l'influence de chacune des composantes hémodynamiques (PAD, PAS et PP) comme indicateur du risque de développement de pathologies cardiovasculaires est modulée de manière bien précise. Chez les jeunes adultes, c'est-à-dire âgée de moins de 50 ans, la PAD renseigne de manière égale à la PAS quant aux risques de développement de maladies cardiovasculaires⁷⁹. Tout au long de la cinquantaine, l'importance de la PAD s'estompe en faveur de la PAS, et au-delà de la soixantaine la

PP prend une place prédominante⁷⁶. L'hypertension artérielle chez les jeunes adultes peut impliquer une élévation unique de la PAD⁷². Toutefois, elle peut être accompagnée d'une élévation de la PAS. Ces modifications hémodynamiques sont associées à une altération des artères de résistances. Elle est consécutive de l'augmentation de la résistance périphérique, mais aussi de la chute de l'amplification de l'onde de la pression pulsée⁷⁶. Au cours du XXIème siècle, l'élévation de la PAD a été démontrée comme un facteur hémodynamique important à surveiller quant au développement des problèmes cardiovasculaires. Ceci peut s'expliquer par une analyse davantage effectuée auprès de jeunes hypertendus⁸⁰. Aujourd'hui, il est suggéré que la PAD augmente de manière constante jusqu'à environ 55 ans et que par la suite cette valeur de pression diminue (Figure 1.4). De plus, la PAS s'élève progressivement jusqu'à environ 80 ans (Figure 1.4). Il est suggéré qu'entre cinquante et soixante ans, la rigidité des artères de conductance devient plus marquante et explique la plus grande influence de la PAS comme facteur de risque de développement de pathologies cardiovasculaires. Au-delà de la soixantaine, il est proposé que la PAS prédomine sur la PAD comme facteur de risque dans le développement de pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'élévation de la PP serait encore plus importante, spécialement lorsque la PAD est très réduite⁸¹ (Figure 1.4).

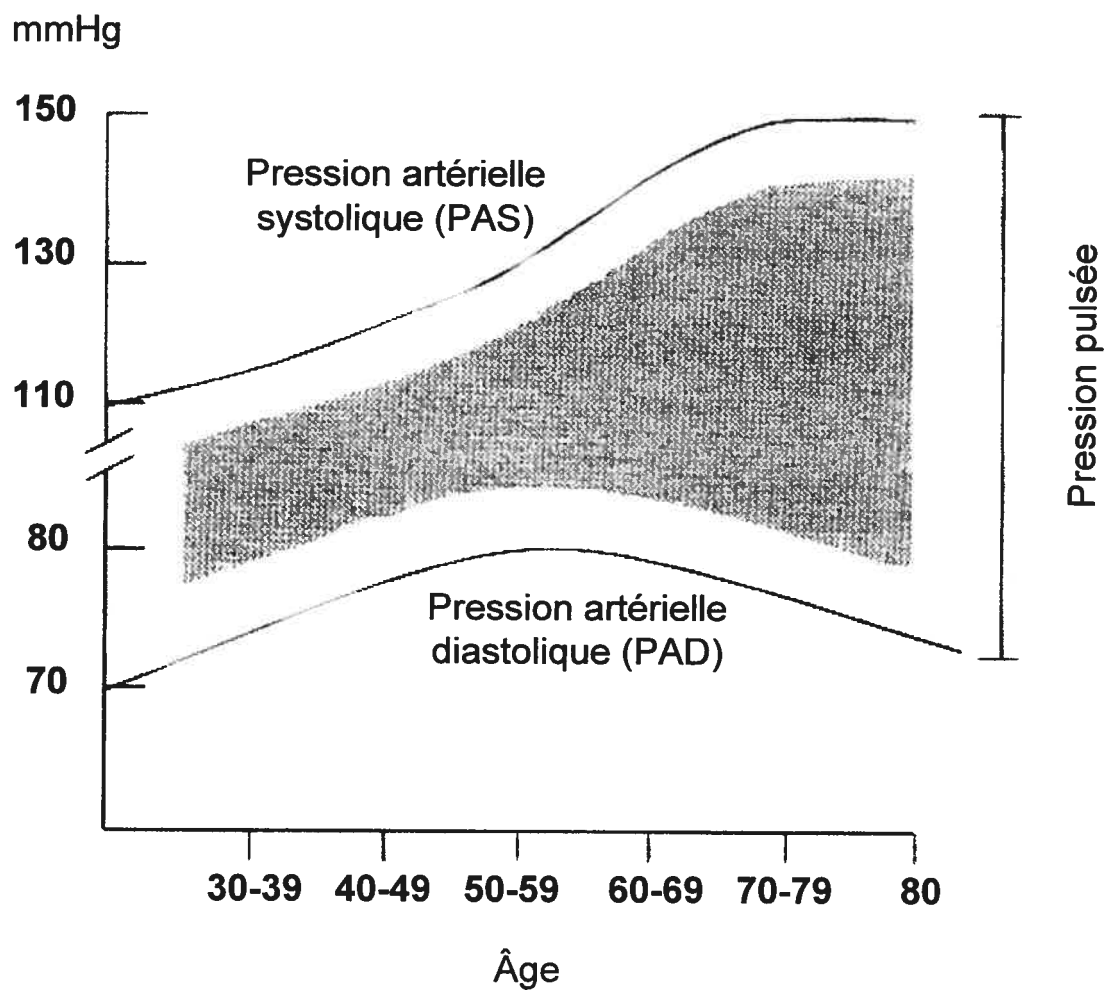


Figure 1.4 Évolution de la PAS et de la PAD en fonction de l'âge

(Adapté de Burt, V.L. et al. *Hypertension* 1995; 25:305)

L'âge influence le risque potentiel relié à chacun des facteurs hémodynamiques. Bien qu'une élévation de la PAD caractérise davantage les patients hypertendus âgés de moins de cinquante-cinq ans, seule une faible proportion de la population hypertensive présente une élévation unique de la PAD⁷². Au contraire, l'hypertension systolo-diastolique est observée dans une proportion plus importante parmi les patients hypertendus⁸². Par ailleurs, la moitié de la population âgée de plus de soixante ans est hypertendue et environ 30% des personnes formant cette tranche de la société canadienne présente une HSI^{82,83}. Ainsi, il semble bien établi qu'une élévation de la PAS est généralement impliquée dans le développement de l'hypertension. De plus, il est considéré comme le paramètre hémodynamique le plus révélateur du risque de développement de maladies cardiovasculaires. Conséquemment, la cible primaire dans le traitement de l'hypertension artérielle consiste à abaisser la PAS⁷².

1.3 L'HYPERTENSION

1.3.1 L'hypertension artérielle

Généralités

L'hypertension artérielle constitue un état pathologique fort complexe, car son étiologie est hétérogène. Elle se définit par une pression artérielle systolique et diastolique égale ou supérieure à 140/90 mmHg⁸⁴. Toutefois, il s'avère important de préciser qu'une élévation unique de la pression artérielle systolique puisse se manifester chez certains patients. Ce type d'hypertension artérielle est défini comme étant de l'HSI. Ainsi, bien que les artères de résistance semblent être importantes au contrôle de la pression artérielle, il est de plus en plus évident que les artères de conductance participent au maintien de la pression artérielle. Chez l'être humain, la pression artérielle normale présente généralement un ratio systolo-diastolique de 120/80 mmHg. Un contrôle inadéquat de la pression artérielle a été démontré comme un facteur de risque majeur au développement de pathologies vasculaires cérébrales, cardiaques et rénales⁸⁵. Les risques de développer un problème cardiovasculaire s'accroissent lorsque les pressions systolique

et diastolique s'élèvent au-delà des valeurs normales. De plus, l'apparition de problèmes cardiovasculaires devient encore plus éminente lorsque la pression systolique et diastolique s'élève de façon chronique au-delà des limites supérieures de 140/90 mmHg et qu'aucune mesure thérapeutique n'est dirigée.

1.3.2 L'hypertension artérielle et la modulation neurohumorale

À l'intérieur d'un même type d'hypertension, un nombre important de facteurs et de mécanismes peuvent contribuer aux changements physiopathologiques⁸⁶. La recherche sur l'hypertension artérielle captive l'intérêt des scientifiques depuis de nombreuses années et elle doit se poursuivre car même si des découvertes importantes, du point de vue physiopathologique, ont été réalisées au cours des dernières décennies, les travaux les plus récents nous permettent de constater l'hétérogénéité ainsi que la complexité du problème de l'hypertension artérielle. Le développement de cette condition physiopathologique implique plusieurs acteurs. Parmi les plus importants, on retrouve le SRA et le SNS (système nerveux sympathique). L'endothélium possède aussi une place prédominante dans l'établissement de l'hypertension artérielle. Au cours des prochaines sections, l'implication de ces éléments sera discutée dans ce contexte pathologique. De même, les interactions existantes entre le SRA, le SNS et le dysfonctionnement endothélial seront discutées et permettront de faire une mise au point concernant ces interactions qui semblent hautement importantes dans la compréhension physiopathologique de l'hypertension artérielle⁸⁷.

1.3.3 Le système rénine-angiotensine et l'hypertension

La biosynthèse classique de l'angiotensine II

L'angiotensine II représente un octapeptide formé suite à une cascade de réactions enzymatiques. (Figure 1.5). C'est la rénine qui constitue le point de départ de cette biocascade. En réponse à une chute de la pression artérielle, les cellules granulaires de

l'appareil juxta-glomérulaire libère de la rénine. Ces cellules sont localisées dans la paroi de l'artériole afférente et sont proximales au glomérule. La rénine est initialement synthétisée et emmagasinée sous forme de pro-rénine et lors d'une baisse de la tension à l'intérieur de la paroi artériolaire afférente, les cellules granulaires hydrolysent la pro-rénine afin de libérer sa forme active qui est la rénine⁸⁸. Une fois dans la circulation artérielle intra-rénale, la grande majorité de la rénine se distribue à travers le réseau vasculaire systémique. Il est aussi à noter que deux autres mécanismes de sécrétion de rénine ont été identifiés⁸⁸. Une chute de la concentration plasmatique en chlorure de sodium (NaCl) est captée par les cellules épithéliales de la macula densa du tube contourné distal. La macula densa étant adjacente à l'appareil juxta-glomérulaire, un signal chimique est dirigé des cellules épithéliales de la macula densa vers les cellules granulaires de l'appareil juxta-glomérulaire afin d'augmenter la sécrétion de rénine. Un dernier mécanisme de sécrétion de rénine consiste dans l'activation de récepteurs β -adrénergiques. La membrane plasmatique des cellules granulaires de l'appareil juxta-glomérulaire est munie de récepteurs β_1 -adrénergiques. Ainsi, suite à une libération de norépinéphrine (NE) des fibres sympathiques post-ganglionnaires, une activation des récepteurs β_1 -adrénergiques augmente la sécrétion de rénine.

La rénine constitue une enzyme protéolytique et son principal rôle est de cliver l'angiotensinogène, une protéine plasmatique d'origine hépatique et former un décapeptide, soit l'angiotensine I (Ang I). Sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA), l'Ang I est hydrolysé dans les petites artères pulmonaires en un octapeptide appelé l'angiotensine II (Ang II)⁸⁹. De plus, l'Ang I peut prendre une voie alternative et sous l'action de trois types d'endopeptidases neutres (EPNs), EPN 24.11, EPN 24.15, EPN 24.26, elle est hydrolysée en Ang (1-7)⁹⁰. L'Ang II est dégradé par des aminopeptidases en ses métabolites, soit l'Ang III, l'Ang IV, l'Ang (1-7) et l'Ang (3-8) qui se retrouvent dans la circulation ainsi que dans le cœur, le rein et la paroi vasculaire⁹¹. Finalement, l'activité de protéases circulantes et tissulaires permet de dégrader l'Ang II et ses fragments actifs (Ang III, Ang IV, Ang 1-7 et 3-8) en fragments inactifs⁹².

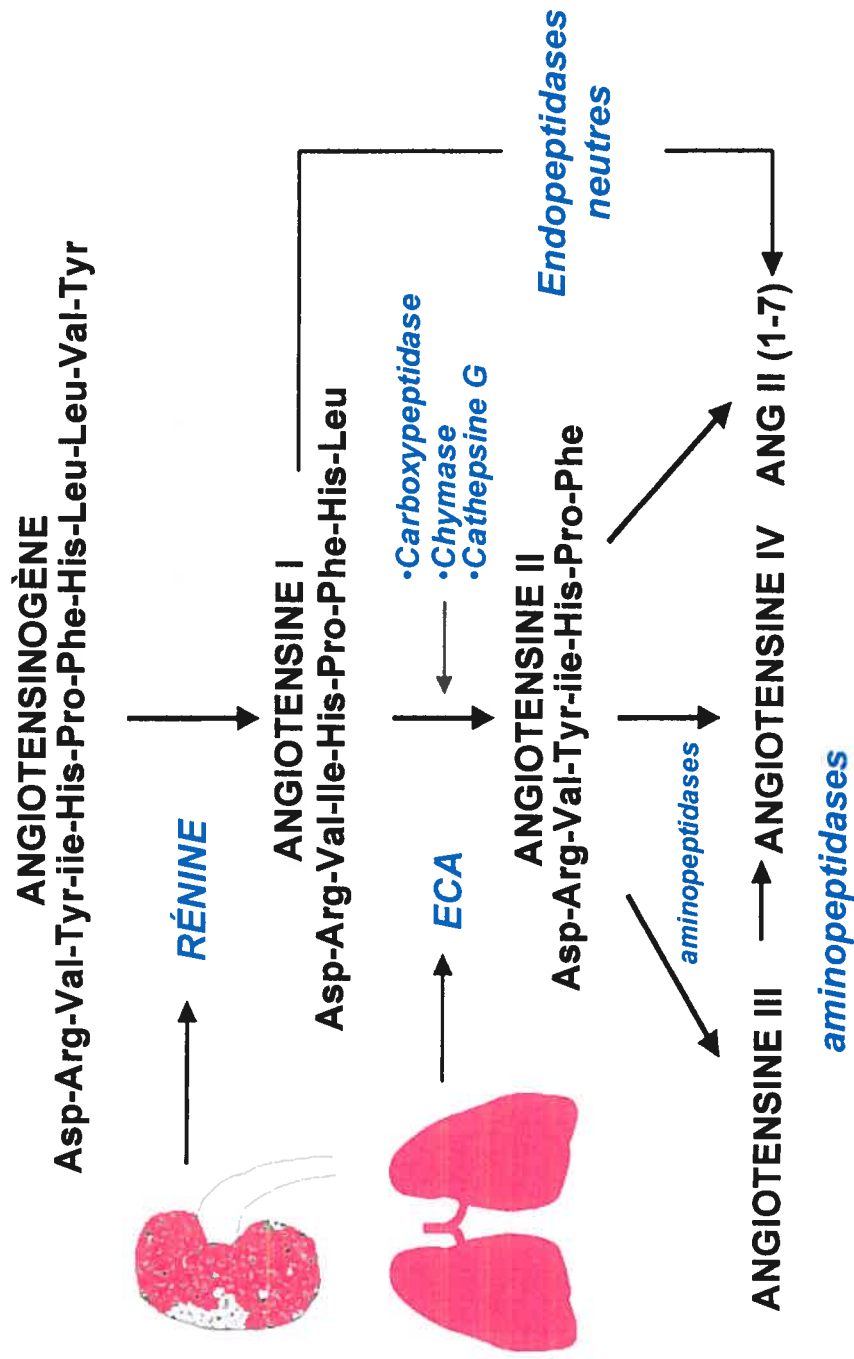


Figure 1.5 Représentation classique du système rénine-angiotensine
(Adapté de Touyz, R.M. et al. *Pharmacol Rev* 52: 639, 2000 [1])

La biosynthèse locale de l'angiotensine II

La biosynthèse de l'Ang II a été d'abord identifiée comme une cascade de réactions enzymatiques dépendantes de la circulation systémique. Toutefois, il est maintenant connu que la contribution intégrée des reins, du foie et des poumons ne constitue pas le seul mécanisme de formation de l'Ang II⁹¹. Plusieurs composantes du SRA existent dans le cœur, le cerveau, la paroi vasculaire, les glandes surrénaliennes, les reins, le foie, le tissu adipeux et l'appareil reproducteur, suggérant l'existence d'un SRA local^{93, 94}. Bien que son rôle n'ait pas encore été complètement défini, le SRA local semble très important dans la régulation du débit sanguin local⁹⁵. En fait, à l'exception de la rénine, toutes les composantes du SRA ont été identifiées dans la paroi vasculaire⁹⁶. L'ECA a été précédemment localisé en grande concentration dans l'adventice, mais aussi dans les cellules musculaires lisses et au niveau des cellules endothéliales. De même, l'angiotensinogène peut être synthétisé par ces deux types cellulaires. L'ECA possède un rôle déterminant dans la synthèse locale de l'Ang II. Toutefois, aucune évidence ne permet d'affirmer l'existence d'une production locale de rénine dans la paroi vasculaire⁹⁶. En opposition, certains organes sont en mesure de produire de la rénine, de même que certains territoires vasculaires périphériques⁹⁶. Néanmoins, il est suggéré que la production locale d'Ang II dépend essentiellement de la rénine sécrétée par l'appareil juxta-glomérulaire du rein. Il est aussi possible que l'Ang II soit produit par une voie non-dépendante de la rénine systémique^{97, 98}. De plus, les enzymes alternatives à l'ECA telle la carboxypeptidase, la chymase et la cathepsine G, qui sont impliquées dans l'hydrolyse de l'Ang I en Ang II ont été démontrées comme très importantes en condition pathologique et spécialement dans la production locale aux niveaux cardiaque, rénal et vasculaire⁹³.

Les types de récepteurs à l'angiotensine II et leur localisation

Au cours de la fin du dernier siècle, des percées importantes dans le développement d'analogues à l'Ang II ont permis de caractériser deux types de récepteurs distincts liant cet octapeptide⁹⁹. Les récepteurs AT₁ et AT₂ ont été identifiés comme les responsables des effets induits par l'Ang II. D'un point de vue cardiovasculaire, ils produisent des

effets opposés qui permettent de conserver un équilibre physiologique. Bien que ces deux récepteurs soient généralement identifiés comme les seuls récepteurs du SRA, deux autres récepteurs ont aussi été décrits et associés à ce système⁹¹. Ce sont les récepteurs AT₃ et AT₄. Le premier est exprimé dans une lignée cellulaire tumorale et possède une grande affinité pour l'Ang II¹⁰⁰. Le deuxième semble être présent dans plusieurs organes dont le cœur et l'Ang IV constitue son seul ligand¹⁰¹. La caractérisation de ces deux récepteurs n'est pas complètement définie. Leurs rôles physiologiques sont encore incertains et c'est ce qui explique qu'ils ne sont pas officiellement considérés comme des récepteurs du SRA.

Le récepteur AT₁ est constamment exprimé dans l'organisme humain, dès le début du développement embryogénique jusqu'à l'âge adulte¹⁰². Chez l'homme, il a été principalement identifié au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des reins (glomérule, complexe juxta-glomérulaire, tube contourné proximal, vasa recta) et de l'hypophyse⁹⁹. Toutefois, une distribution tissulaire beaucoup plus large a été étudiée chez le rat. Le récepteur AT₁ constitue un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé aux protéines G. La signalisation cellulaire induite lors de l'activation de ce récepteur ne sera pas élaborée davantage, car ceci constitue le sujet d'une prochaine section. Toutefois, le couplage de l'Ang II au récepteur AT₁ produit la grande majorité des effets physiologiques associés à l'Ang II, spécialement au niveau du territoire vasculaire⁹¹. Le récepteur AT₁ est hautement exprimé dans la paroi vasculaire, plus précisément dans les CMLVs formant la tunique médiale¹⁰³. En contre-partie, son expression est faible dans l'adventice et pratiquement absente au niveau de l'endothélium¹⁰³. Il existe deux sous-types de récepteurs AT₁. Ce sont les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B}. Pharmacologiquement, ces deux sous-types sont identiques et leur fonctionnement post-récepteuriel est aussi identique⁹⁶. Toutefois, ils ne sont pas exprimés et régulés de la même façon¹⁰⁴. Bien que le sous-type A soit le récepteur AT₁ prédominant dans la majorité des organes, le sous-type B est plus abondant dans les glandes surrénales et hypophysaires¹⁰⁵. Au niveau vasculaire, le sous-type A est grandement relié à la régulation du tonus vasculaire. Le sous-type B est aussi présent

dans les vaisseaux périphériques et son activation semble influencer le tonus vasculaire⁹⁶.

Le récepteur AT₂ représente un récepteur à sept passages transmembranaires, couplé aux protéines G. Il joue un rôle majeur lors du développement embryogénique de plusieurs tissus et de plusieurs organes. Néanmoins, dès les premières semaines de vie, son expression chute rapidement¹⁰⁶. Bien qu'il demeure faiblement exprimé dans le pancréas, le cœur, les reins, les glandes surrénales, le cerveau et les vaisseaux sanguins, la synthèse de ce récepteur est réactivée, à l'âge adulte par différents processus pathologiques^{91, 107}. À l'intérieur du territoire vasculaire, ce récepteur est essentiellement présent dans la tunique de l'adventice et à un degré moindre dans la média¹⁰⁸. Comme il sera expliqué au cours de la prochaine section, l'activation du récepteur AT₂ semble induire des effets opposés à ceux qui sont produits suite à l'activation du récepteur AT₁. De plus, la signalisation cellulaire associée à l'activation de ce récepteur ainsi que ces rôles fonctionnels demeurent encore mal compris.

Les effets physiologiques de l'angiotensine II

Il est suggéré que l'Ang II produite par le SRA systémique contribue, en condition physiologique, à la régulation de la pression artérielle moyenne. Suite à la formation de l'Ang II, cette dernière stimule le récepteur AT₁ et permet la contraction des CMLVs⁹¹. Elle peut aussi élever la pression artérielle de façon indirecte. La présence du récepteur AT₁ dans la portion pré-synaptique des axones sympathiques facilite la libération de NE et favorise la vasoconstriction. L'Ang II peut stimuler le système nerveux central (SNC) et induire la sécrétion d'arginine vasopressine (AVP). Celle-ci intervient au niveau des tubules rénaux et permet une réabsorption hydrique de même qu'une vasoconstriction des artères de résistance. De même, l'Ang II agit au niveau du cortex-surrénalien. Suite à l'activation du récepteur AT₁, une libération d'aldostérone est induite favorisant la réabsorption sodique et hydrique au niveau rénal. Cette réabsorption peut aussi s'effectuer suite à une activation directe du récepteur AT₁ situé au niveau de ces mêmes tubules. Le cœur est central au contrôle de la pression artérielle moyenne et l'Ang II

influence l'éjection systolique suite à une activation de ces récepteurs AT_1 localisés au niveau des cardiomyocytes. De cette façon, l'Ang II représente un agent inotrope positif, car il augmente la contraction cardiaque et conséquemment contribue à l'élévation de la pression artérielle. Finalement, l'Ang II permet une hausse de la pression artérielle en stimulant le centre de la soif qui se retrouve au niveau de l'hypothalamus.

L'Ang II est très important au cours du développement fœtal et ses effets impliquent l'activation du récepteur AT_2 qui est hautement exprimé lors de cette période¹⁰⁹. Au moment de la formation des vaisseaux artériels, les CMLVs sont immatures et elles se retrouvent dans un état de croissance et de différenciation. L'Ang II contribue, par l'activation du récepteur AT_2 , aux mécanismes de dédifférenciation cellulaire associés au développement de l'arbre artériel. L'expression accrue du récepteur AT_2 , lors de cette phase de la vie, contribue aussi à la différenciation cellulaire impliquée dans le développement de plusieurs autres organes, comme les reins et le cerveau¹⁰⁹. La stimulation de ce récepteur entraîne aussi des phénomènes apoptotiques souvent associés à des atteintes tissulaires¹⁰⁹. L'activation du récepteur AT_2 permet un effet vasodilatateur à l'âge adulte, mais aussi au cours du développement foetal. D'ailleurs, il est proposé que ce mécanisme protégerait le fœtus contre d'éventuelles périodes d'ischémie¹¹⁰. Dans cette condition, l'Ang II proviendrait de la mère, et, par le placenta, atteindrait le fœtus. On caractérise généralement les effets sous-jacents à l'activation des récepteurs AT_1 et AT_2 d'antagonistes. L'activation du récepteur AT_1 contribue aux mécanismes associés à l'élévation de la pression artérielle, mais aussi comme il sera traité au cours de la prochaine section, elle participe à la croissance, à la différenciation et à la migration cellulaire⁹¹. De plus, sa stimulation est étroitement reliée à la production d'éléments de la matrice extracellulaire. En contre-partie, le récepteur AT_2 implique un effet vasodilatateur, anti-prolifératif et anti-hypertrophique⁹¹. L'importance physiologique réelle du récepteur AT_2 chez l'homme adulte reste malgré tout à être prouvée⁹⁹. Toutefois, il est rapporté en condition pathologique que le bénéfice associé au blocage du récepteur AT_1 implique l'activation du récepteur AT_2 par l'Ang II¹¹¹. Ainsi, les évidences expérimentales qui démontrent plusieurs bénéfices suite à l'activation du récepteur AT_2 suggèrent un rôle cardio- ainsi que vasculo-protecteur à ce récepteur.

La modulation et le blocage du système rénine-angiotensine dans l'hypertension artérielle

Le SRA systémique est essentiel au contrôle aigu de la pression artérielle. Comme il a été décrit précédemment, le SRA systémique, par l'intermédiaire d'un certain nombre de mécanismes, contribue au maintien de la perfusion des nombreux tissus et organes composant notre organisme. Toutefois, l'intervention du SRA peut devenir mal adaptée et dans l'hypertension artérielle comme en présence de plusieurs autres altérations cardiovasculaires, une surproduction d'Ang II est induite et participe au développement de l'état pathologique. Le SRA local pourrait être responsable des effets à long terme de l'Ang II, telle l'hypertrophie vasculaire et cardiaque¹¹². La prolifération et la migration cellulaire, de même que la production accrue d'éléments de la matrice-extracellulaire et l'inflammation seraient impliquées dans l'action chronique de l'Ang II⁹¹. C'est suite à l'activation de son récepteur AT₁ que ses effets sont mis en place et qu'ils contribuent au développement des complications vasculaires et cardiaques associées à l'hypertension artérielle. Il est de plus en plus évident que l'implication du SRA dans le développement de l'hypertension artérielle engendre des changements complexes qui vont au-delà d'une modulation hémodynamique. En ce sens, l'Ang II est identifié comme un facteur majeur, responsable des complications associées à l'hypertension artérielle¹¹³. Le blocage du SRA constitue donc une intervention pharmacologique désirable dans la thérapeutique de l'hypertension artérielle. Le but premier est de maîtriser la pression artérielle, mais de plus ces outils permettent de mieux prévenir le remodelage cardiovasculaire et l'apparition d'états pathologiques comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et l'AVC^{114, 115}.

L'inhibition de l'ECA fut la première intervention, associée au blocage du SRA, utilisée en clinique. En présence d'hypertension artérielle, ce blocage du SRA a permis d'abaisser significativement la pression artérielle de nombreux patients^{116, 117}. Par contre, il est démontré que les taux plasmatiques d'Ang II recouvrent leurs valeurs initiales suite à une utilisation chronique. L'activité des voies alternatives à l'ECA (Figure 1.5) n'est pas bloquée par ces inhibiteurs et permet la formation d'Ang II¹¹⁸. Néanmoins, l'efficacité de ces agents pharmacologiques semble être excellente à long terme. Une

explication à cette efficacité réside dans la diminution de la dégradation de la bradykinine (BK) par l'ECA. Il est démontré que l'action des inhibiteurs de l'ECA (IECAs) augmente les niveaux plasmatiques de la BK et suite à une interaction avec son récepteur B_2 , la BK contribue aux effets antihypertenseurs et antiprolifératifs de ces agents¹¹⁹. Toutefois, l'élévation des taux plasmatiques de BK, suite à l'utilisation des IECAs, induit chez environ 5 à 10 % des patients, des effets secondaires comme une toux sèche qui limite leur utilisation¹²⁰.

Afin de pallier aux effets secondaires induits par l'utilisation des IECAs, une autre intervention consistant à bloquer le récepteur AT_1 de l'Ang II a été développée. Les effets secondaires rapportés précédemment ne sont pas retrouvés et l'abaissement de la pression artérielle produit par les ARAs reste similaire à celui induit par l'action des IECAs¹²¹. Ainsi, contrairement aux IECAs, les ARAs n'interviennent pas au niveau du catabolisme de certains peptides, comme la BK. L'inhibition du récepteur AT_1 bloque spécifiquement les effets du SRA associés au développement de l'hypertension artérielle, mais il augmente la concentration plasmatique d'Ang II. Cette hausse des niveaux plasmatiques d'Ang II induit des bénéfices pharmacologiques supplémentaires en activant le récepteur AT_2 ¹²². Le récepteur AT_2 est peu exprimé en état physiologique et ce n'est qu'en présence d'un état pathologique, comme l'hypertension artérielle, que la synthèse de ce récepteur est réactivée¹⁰⁷. Plusieurs évidences démontrent que le récepteur AT_2 est impliqué dans l'action anti-hypertenseur des antagonistes AT_1 ¹¹⁹. L'Ang II étant incapable d'activer le récepteur AT_1 , son interaction avec le récepteur AT_2 devient alors plus importante. Il en découle une production de BK et suite à une activation de son récepteur B_2 , il y a une sécrétion de NO (monoxyde d'azote) et de prostaglandines, deux médiateurs associés à une action vasodilatatrice. De même, en présence d'un blocage du récepteur AT_1 dans des conditions hypertensives, post-angioplasties et subséquentes à un infarctus du myocarde, des effets pro-apoptotiques, anti-prolifératifs et anti-hypertrophiques sont produits par l'activation du récepteur AT_2 ¹⁰⁷.

L'action des IECAs permet de bloquer une voie de synthèse de l'Ang II. Bien que ces agents aient démontré une certaine efficacité dans le traitement de l'hypertension

artérielle, il est observé que même si les taux d'Ang II circulant dans le sang peuvent être abaissés, les taux tissulaires peuvent demeurer élevés¹²³. Ceci s'explique par l'action des voies alternatives, comme celles des EPNs. Ainsi, des inhibiteurs mixtes de l'ECA et des EPNs ont été créés et semblent pouvoir apporter des bénéfices additionnels sur l'abaissement de la pression artérielle en hypertension artérielle¹²⁴. Une hausse de la guanylate monophosphate cyclique (GMPc), sous-jacente à une diminution de la dégradation de l'Ang 1-7, de même qu'une augmentation des peptides natriurétiques et des kinines contribueraient à l'effet vasodilatateur de ces nouveaux agents. Une hausse de la natriurèse ainsi qu'une diminution des taux de rénine plasmatiques sont aussi associés aux bénéfices de ces nouveaux agents. Toutefois, aucune explication n'a été suggérée concernant ces dernières observations¹²⁴. L'étude OCTAVE a permis de confirmer ces résultats en rapportant un bénéfice supplémentaire sur la baisse de la pression artérielle lors de l'inhibition mixte ECA/EPN en comparaison de l'inhibition simple de l'ECA chez des patients hypertendus¹²⁵. L'inhibition mixte ECA/EPN démontre un meilleur effet sur l'abaissement de la pression artérielle, toutefois son utilisation accentue les risques d'angio-œdème retrouvés avec l'utilisation d'IECAs, et ces risques atteignent davantage les patients de race noir d'origine ethnique afro-américaine¹²⁶.

La rénine possède un seul substrat, soit l'angiotensinogène. Son action spécifique pour la formation de l'Ang I permet de croire que l'inhibition de cette enzyme permettrait d'obtenir des résultats similaires aux autres inhibiteurs du SRA mais pas identiques¹²⁷. Les IECAs et les antagonistes du récepteur AT₁ interagissent à différents niveaux et peuvent conserver des niveaux plasmatiques élevés de rénine, d'Ang I et d'Ang II suite à leur utilisation. Bien qu'ils sont efficaces, l'apparition d'effets secondaires pourrait être atténuée suite à un blocage de la rénine¹²⁸. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de la synthèse de la rénine pourrait s'avérer une alternative intéressante dans le traitement de l'hypertension artérielle, la néphropathie, l'insuffisance cardiaque et l'athérosclérose¹²⁷. Toutefois, jusqu'à présent, ces agents ne sont pas encore commercialisés.

1.3.4 Le système sympathique et l'hypertension artérielle

Le SNS comprend une composante centrale ainsi que périphérique (SNP). À la base du cerveau, plus précisément au niveau médullaire, différents noyaux ont été identifiés comme des centres importants dans le contrôle aigu et chronique de la pression artérielle. Ce sont le bulbe rachidien et le noyau fasciculé solitaire qui sont généralement reconnus pour l'intégration des informations nécessaires au contrôle de la pression artérielle¹²⁹. Ces structures sont constamment en interactions avec d'autres centres du SNC. Elles sont aussi influencées par des informations en provenance de la périphérie. Ceci implique l'intégration des influx nerveux provenant du cortex cérébral, de l'hypothalamus, des barorécepteurs aortiques et carotidiens, des barorécepteurs provenant du système cardio-pulmonaire et des chémorécepteurs périphériques¹³⁰. Ils contribuent tous à la modulation adéquate et précise de la pression artérielle¹²⁹. Le système nerveux périphérique est très important dans cette intégration. Ses voies nerveuses afférentes atteignent les centres d'intégration cardiovasculaire et ainsi elles permettent d'acheminer en provenance du réseau artériel, des muscles squelettiques et des organes vitaux, les changements à apporter afin de bien contrôler la pression artérielle¹³¹. Finalement, pour compléter son action de contrôle de la pression artérielle, des voies efférentes quittent les centres médullaires et atteignent les artères de résistance, les médullo-surrénales, le cœur et les reins¹³⁰.

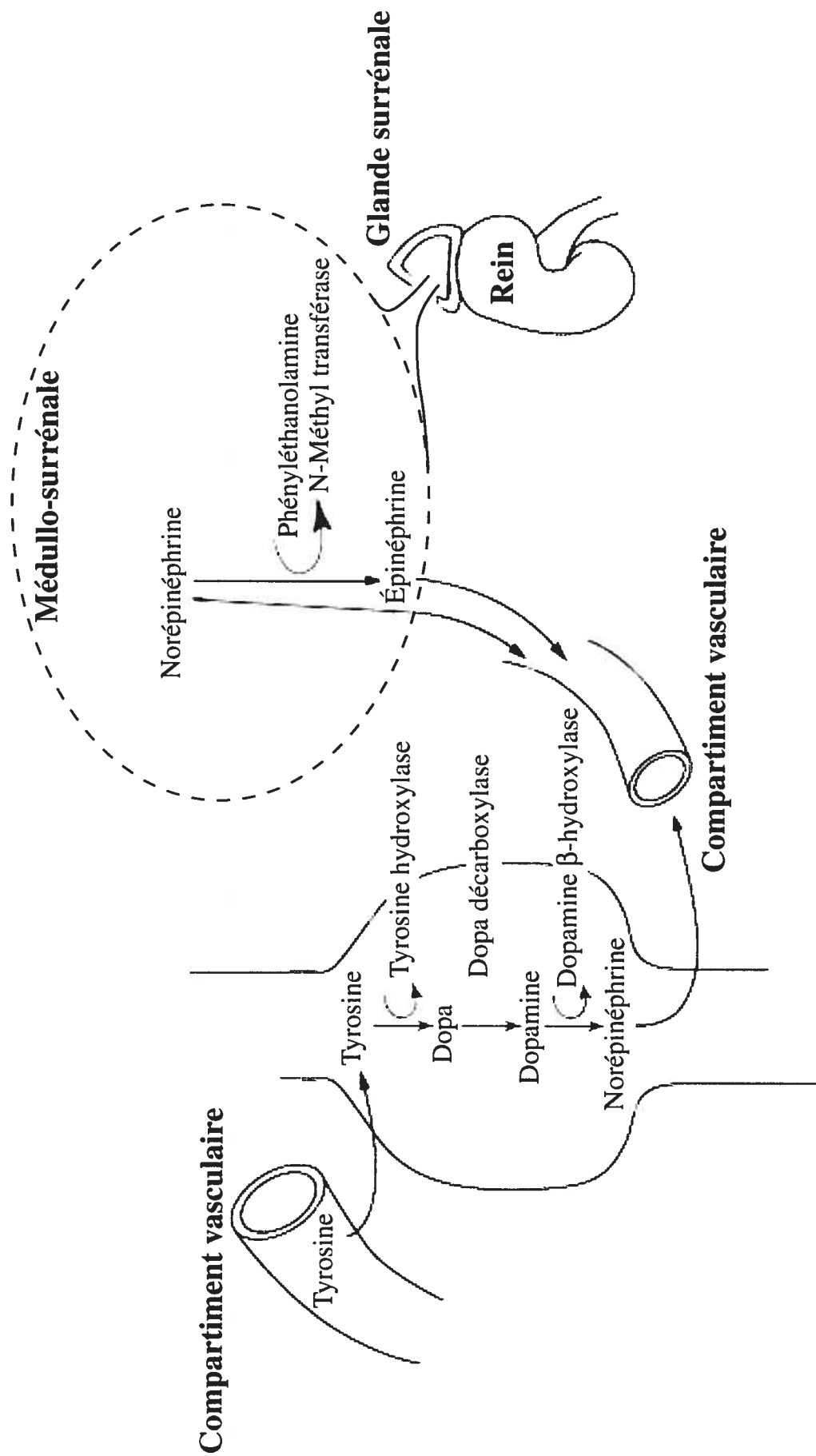
La biosynthèse, la recapture et le catabolisme des catécholamines

La NE et l'épinéphrine (Épi) constituent les deux neurohormones impliquées dans l'action du SNS. Elles forment avec la dopamine (DA) la famille des catécholamines. Bien que dans le cadre de cette thèse, la DA ne soit pas d'intérêt, il importe de noter que cette troisième neurohormone possède un rôle important dans la transmission nerveuse au niveau du SNC et que son rôle est limité dans la régulation du SNP¹³². La NE et l'Épi originent de la même voie de synthèse. Toutefois, ces deux catécholamines ne sont pas nécessairement synthétisées aux mêmes sites anatomiques. L'Épi est produite par les cellules chromaffines qui sont localisées en condition physiologique dans les glandes médullo-surrénales. La NE peut aussi être synthétisée au niveau de ces glandes, mais

elle est majoritairement produite au niveau des varicosités des fibres post-ganglionnaires sympathiques.

Les catécholamines synthétisées à l'intérieur de ces varicosités nécessitent, à la base, la tyrosine qui est un acide aminé libre se retrouvant dans le compartiment vasculaire (Figure 1.6). L'action d'enzymes et de co-facteur est essentielle à la formation de ces neurohormones qui sont produites à l'intérieur du compartiment cytoplasmique des varicosités sympathiques¹³³. Ainsi, une succession de réactions biochimiques est enclenchée pour finalement produire la NE. Cette catécholamine est emmagasinée dans ces vésicules avec de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), de la dopamine β -hydroxylase, des chromagranines, de l'acide ascorbique ainsi quelques autres peptides¹³⁴.

Les mécanismes sous-jacents à la libération de la NE impliquent un nombre important d'événements de signalisations cellulaires¹³⁵. Bien que plusieurs protéines intracellulaires soient identifiées comme éléments contribuant à la libération de la NE, le processus d'exocytose demeure chargé d'interrogations. Somme toute, la diffusion d'ions de calcium (Ca^{2+}) du liquide interstitiel vers l'intérieur de la varicosité sympathique constitue l'événement déclencheur permettant la libération de la NE¹³⁶. L'arrivée d'un potentiel d'action le long de l'axone d'une fibre post-ganglionnaire sympathique induit une ouverture de canaux calciques dépendant du voltage. Cette augmentation intraneuronale d'ions de Ca^{2+} interagirait avec certaines protéines retrouvées au sein des varicosités afin de libérer par exocytose la NE dans l'espace synaptique. Ainsi, la NE peut induire ces effets en se liant aux récepteurs post-synaptiques, en l'occurrence les récepteurs α - et β -adrénergiques (Figure 1.7).



Varicosité sympathique

Figure 1.6 Représentation de la biosynthèse des catécholamines

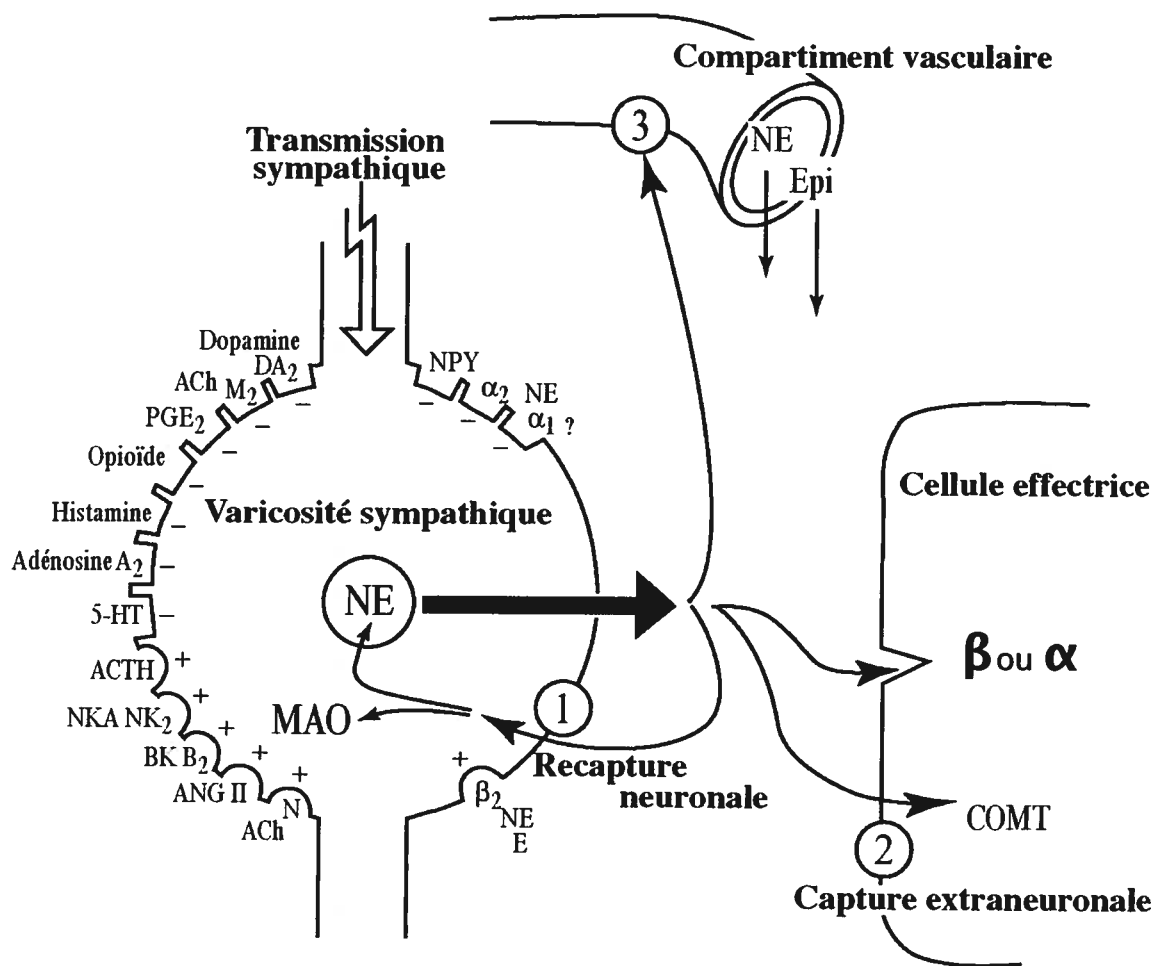


Figure 1.7 Modulation de la neurotransmission sympathique, recapture et catabolisme de la norépinéphrine

(Adapté de de Champlain, J. J of Hypertension 8 (suppl 7): S77, 1990)

Au niveau périphérique, la NE constitue une catécholamine qui possède une activité stimulante (i.e. un effet vasoconstricteur) très importante et un effet inhibiteur (i.e. un effet vasodilatateur) pratiquement inexistant¹³⁷. Toutefois, l'Épi qui est une catécholamine libérée par les glandes médullo-surrénales possède une action autant excitatrice qu'inhibitrice¹³⁷. Les catécholamines libérées par les glandes médullo-surrénales seront discutées éventuellement, toutefois il peut être souligné qu'au moment où elles sont libérées, elles empruntent la circulation systémique et elles agissent comme des hormones (Figure 1.6). Elles peuvent donc atteindre facilement plusieurs tissus, de même que différents types de récepteurs adrénergiques accessibles via la circulation.

Suite à la libération de la NE dans l'espace synaptique, l'action de cette catécholamine peut être interrompue grâce à trois mécanismes. Ce sont les mécanismes de recapture neuronale (uptake-1), de capture extraneuronale (uptake-2) et de diffusion (spillover) dans la circulation systémique. Ces mécanismes sont illustrés à la figure 1.7 et sont désignés comme suit: 1- recapture neuronale, 2-capture extraneuronale et 3- diffusion dans la circulation systémique.

Les médullo-surrénales

Contrairement aux fibres du SNS, de l'Épi est majoritairement synthétisée (80%) à l'intérieur des cellules chromaffines qui composent les glandes médullo-surrénales (Figure 1.6). De plus, une quantité de NE est produite mais en concentration beaucoup moins importante (20%). On peut considérer les glandes médullo-surrénales comme des fibres post-ganglionnaires sympathiques. L'innervation de cette structure endocrine est unique, car ce sont directement des fibres pré-ganglionnaires sympathiques qui stimulent la libération de catécholamines.

Similairement aux fibres sympathiques, la synthèse de la NE nécessite les mêmes cascades biochimiques dans les cellules chromaffines des glandes médullo-surrénales (Figure 1.6). De plus, la formation de l'Épi s'effectue à partir de la NE. Cette dernière

catécholamine diffuse hors des vésicules vers le cytoplasme afin d'être méthylée par l'enzyme phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) et former l'Épi (Figure 1.6). Suite à sa formation, l'Épi retourne dans ses vésicules respectives afin d'y être emmagasinée avant d'être larguées dans la circulation sanguine.

Les récepteurs du système sympathique et leur localisation

Le SNS se compose de deux grandes classes de récepteurs adrénergiques. Ce sont les récepteurs β - et α -adrénergiques. Les catécholamines, en l'occurrence la NE et l'Épi, constituent les agonistes endogènes de ces récepteurs. Faisant suite à leur activation, les catécholamines permettent la régulation de plusieurs fonctions cardiovasculaires. Bien que les récepteurs adrénergiques et leurs influences au niveau vasculaire font partie de notre champs intérêt, il est important de souligner que les récepteurs adrénergiques contribuent à l'homéostasie de plusieurs autres systèmes et organes. Ils sont impliqués dans le fonctionnement des bronches au niveau pulmonaire, dans la régulation du système gastro-intestinal, dans le contrôle oculaire et même dans la sécrétion produite par plusieurs glandes¹³³. Néanmoins, pour les fins de notre discussion, les récepteurs du SNS localisés dans le compartiment vasculaire seront essentiellement abordés.

La fonction des récepteurs α -adrénergiques est associée à la vasoconstriction, et de même un effet vasodilatateur est relié aux récepteurs β -adrénergiques. Toutefois, la fonctionnalité de ces récepteurs est plus complexe. L'activation des récepteurs β -adrénergiques n'entraîne pas systématiquement un effet inhibiteur. À l'intérieur de ce type de récepteurs adrénergiques, il existe des récepteurs β_1 -adrénergiques qui produisent un effet stimulant au niveau des cardiomyocytes et des récepteurs β_2 -adrénergiques qui induisent une action inhibitrice ou vasorelaxante systémique.

Il est bien établi que tous les récepteurs adrénergiques constituent des récepteurs couplés à une protéine G^{137} . Chacun des récepteurs adrénergiques se compose d'une chaîne d'acides aminés, impliquant sept passages transmembranaires et prenant l'allure d'une forme de beigne. Les récepteurs α -adrénergiques sont anatomiquement localisés à la

portion pré- et post-synaptique¹³⁸. À l'origine, la localisation des récepteurs α_1 avait été déterminée au niveau post-synaptique. De plus, les récepteurs α_2 -adrénergiques correspondaient à des récepteurs pré-synaptiques. L'exactitude de ces premières observations a par la suite été révisée, car des récepteurs α_2 -adrénergiques sont aussi présents au niveau post-synaptique¹³⁹. Les récepteurs α -adrénergiques comprennent donc plusieurs sous-types¹³⁸, néanmoins l'intérêt de notre discussion se limitera à la classification initiale, soit celle qui correspond aux récepteurs α_1 - et α_2 -adrénergiques.

Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont retrouvés au niveau des cellules effectrices qui dans le compartiment vasculaire correspondent principalement aux CMLs¹³⁸. Ainsi, à la jonction post-synaptique, ces récepteurs sont préférentiellement stimulés par la NE. Essentielle à la neurotransmission, cette catécholamine est libérée dans la fente synaptique et parvient rapidement aux récepteurs α_1 -adrénergiques. Une contraction des CMLVs s'en suit et se traduit par une vasoconstriction. La participation des récepteurs α_2 -adrénergiques à l'activation de cellules effectrices est davantage associée aux catécholamines circulantes¹³⁸. Cette stimulation qui est attribuée à l'Épi s'explique par une localisation réceptorielle à distance de la jonction synaptique. Ce type de récepteur α -adrénergique, localisé au niveau des CMLVs, permet une vasoconstriction, contribuant à un effet hypertensif. Néanmoins, cet effet est généralement transitoire. Au contraire, en périphérie, la stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques pré-synaptiques inhibe l'activité sympathique (Figure 1.7). De même, l'Épi circulante est en mesure d'inhiber sa propre sécrétion via le même mécanisme d'auto-inhibition au niveau des glandes médullo-surrénales¹⁴⁰. Finalement, des récepteurs α_2 -adrénergiques sont présents à la surface des cellules endothéliales¹³⁸. À l'intérieur de plusieurs lits vasculaires, tels au niveaux cardiaque, rénal et mésentérique, il est rapporté qu'un blocage des récepteurs α_2 -adrénergiques amplifie l'effet vasoconstricteur induit par la NE. En ce sens, une plus grande libération de NO est sous-jacente à une stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques endothéliales qui atténue la vasoconstriction produite suite à l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques post-synaptiques¹⁴¹.

Au niveau vasculaire, parmi les récepteurs β -adrénergiques, ce sont les récepteurs β_2 -adrénergiques qui possèdent la plus grande influence et qui suite à leur activation, induisent une vasorelaxation. Toutefois, contrairement aux récepteurs α_1 -adrénergiques, les récepteurs β_2 -adrénergiques détiennent un rôle de moindre importance dans la régulation du tonus basal vasculaire¹³⁸. Comme il a été discuté plus tôt, les récepteurs α_1 -adrénergiques post-synaptiques sont principalement influencés par la stimulation des nerfs sympathiques, car ils sont localisés à proximité du site de libération de la NE par les varicosités sympathiques. À l'opposé, les récepteurs β_2 -adrénergiques se retrouvent à distance de la région synaptique, expliquant pourquoi leur activation est davantage dépendante de l'Épi qui est la catécholamine sécrétée dans la circulation¹³⁸. De plus, il est démontré que le récepteur β_2 -adrénergique possède une affinité 200 fois plus grande pour l'Épi que pour la NE¹⁴². Au niveau pré-synaptique des récepteurs β_2 -adrénergiques sont aussi présents et l'Épi active ces derniers afin de faciliter la libération de la NE des varicosités sympathiques¹⁴³ (Figure 1.7).

L'auto- et l'hétéro-modulation de la neurotransmission

Depuis déjà plusieurs années, des mécanismes locaux ont été décrits et ont permis de conclure que la régulation de la transmission sympathique constitue un phénomène complexe¹⁴⁴. À la jonction pré-synaptique, une panoplie de récepteurs est maintenant bien identifiée et ils semblent que ces récepteurs contribuent à la régulation de la neurotransmission (Figure 1.7). De même, il appert qu'ils sont présents au niveau des glandes médullo-surrénales, permettant de moduler la sécrétion des catécholamines¹⁴⁵.

Cette modulation peut être qualifiés d'auto-modulation. C'est-à-dire que la modulation d'une libération subséquente de NE dépend de l'action directe de catécholamines sur des récepteurs associés au SNS et localisés à la terminaison nerveuse d'où la NE est libérée. Comme il a été décrit au cours de la section précédente, les récepteurs β_2 -adrénergiques et α_2 -adrénergiques possèdent un rôle important à la jonction pré-synaptique (Figure 1.7). La modulation pré-synaptique semble aussi découler d'une hétéro-modulation (Figure 1.7). C'est-à-dire que la modulation d'une libération subséquente de NE dépend

de l'action directe de neurotransmetteurs ou d'hormones, non-associés au SNS, à leurs récepteurs respectifs et localisés à la terminaison nerveuse d'où la NE est libérée. Ainsi, ces influences pré-synaptiques exposent la complexité de la régulation de la voie sympathique, mais aussi la sensibilité avec laquelle, de manière intégrative, elle s'ajuste en fonction des besoins physiologiques¹⁴⁵. Cet aspect de la modulation pré-synaptique sera abordé à nouveau au cours de la discussion concernant l'interaction entre le SRA et le SNS (Section 1.3.7).

Les effets physiologiques des catécholamines

La libération de la NE par les terminaisons nerveuses sympathiques, de même que la sécrétion des catécholamines par les glandes médullo-surrénales contribuent à la régulation du système cardiovasculaire. Un certain nombre de ces fonctions associées au SNS ont été abordées. Essentiellement, au niveau myocardique, la stimulation nerveuse sympathique constitue un accélérateur en permettant d'activer la fréquence et la contraction myocardique. Bien qu'au niveau vasculaire, l'intervention du SNS puisse induire une vasorelaxation ainsi qu'une vasoconstriction, ce deuxième effet est le plus souvent favorisé lorsque l'activation du SNS implique une libération de NE des terminaisons post-ganglionnaires sympathiques. De plus, il ne faut pas oublier que le SNS régularise une panoplie de fonctions importantes de l'homéostasie systémique¹³³.

L'ampleur de l'implication physiologique du SNS est très impressionnante. Dans son action, il appert essentiel de souligner qu'en comparaison à la NE libérée des terminaisons des fibres sympathiques, l'effet induit par les catécholamines sécrétées par les médullo-surénales, préférentiellement l'Épi, est plus lent à se produire¹³³. De plus, cet effet est maintenu pour une plus longue période de temps, car ces catécholamines agissent comme des hormones et elles dépendent de la circulation systémique¹³³.

Le blocage et la modulation du système nerveux sympathique dans l'hypertension

Une hyperactivité du SNS dans le développement de l'hypertension artérielle est aujourd'hui bien connue. Toutefois, les causes associées au dysfonctionnement de cette voie du SNA restent encore mal comprises. L'hypertension artérielle est un état pathologique qui présente, chez la majorité des patients atteints, une étiologie incertaine. Néanmoins, il est possible de spéculer qu'une hyperactivité du SNS soit consécutive de diverses altérations génétiques et environnementales⁸⁵.

Les patients hypertendus sont atteints, en grande partie, d'une hyperactivité du SNS. Dans une proportion d'environ 40 à 50%, les patients hypertendus présentent des concentrations de catécholamines plasmatiques anormalement élevées¹⁴⁶. Ces plus grandes concentrations en catécholamines plasmatiques découlent d'une libération augmentée et/ou d'une élévation de la sécrétion de catécholamines et n'implique aucune altération des mécanismes de recapture de ces neurohormones¹⁴⁷. Appuyant ces résultats, différents modèles d'hypertension chez le rat ont aussi permis de constater une association directe entre le développement de l'hypertension artérielle et les concentrations en catécholamines mesurées au niveau tissulaire et plasmatique^{148, 149}. De plus, à l'aide de ces mêmes modèles expérimentaux, il a été proposé qu'un dysfonctionnement des mécanismes d'auto-modulations contribuent à cette plus grande présence de catécholamines en circulation et ainsi à cet état hypertensif. Ceci implique une atténuation de l'action inhibitrice associée aux récepteurs α_2 -adrénergiques et une amplification de l'effet facilitateur pré-synaptique relié aux récepteurs β_2 -adrénergiques^{150, 151}. Ces mécanismes pré-synaptiques qui sont aussi localisés aux glandes médullo-surrénales expliquent, de la même façon, la participation de l'axe sympatho-médullo-surrénalien à l'hyperactivité du SNS¹⁵². De plus, il est suggéré que la sécrétion accrue en Épi, associée à l'activité des glandes médullo-surrénales, stimule les récepteurs β_2 -adrénergiques pré-synaptiques et facilite la libération de NE¹⁴³. En accord avec ces observations expérimentales, la sensibilité des récepteurs β_2 -adrénergiques pré-synaptiques est augmentée chez les patients atteints d'hypertension essentielle (HE), mais uniquement chez qui une hyperactivité sympathique est présente¹⁵³.

Sachant que les récepteurs β_2 -adrénergiques sont associés à un effet vasodilatateur, le blocage pharmacologique de ces récepteurs ne semble pas logique. En effet, lors de l'administration d'un antagoniste β -adrénergique, une augmentation de la résistance périphérique est observable, mais rapidement une chute de la résistance périphérique s'établit et expose l'effet antihypertenseur de ce type d'antagoniste¹⁵⁴. L'action antihypertensive associée au blocage des récepteurs β -adrénergiques implique une inhibition des fonctions cardiaques. Néanmoins, sachant que la sécrétion de la rénine soit sous l'influence d'une stimulation β -adrénergique, cet effet antihypertenseur est aussi associé à une suppression de la synthèse d'Ang II. Le mécanisme le plus susceptible de contribuer à l'action antihypertensive des antagonistes β -adrénergiques semble s'établir via le blocage des récepteurs β_2 -adrénergiques pré-synaptiques qui facilite la libération de NE. Ceci prend place au niveau des fibres sympathiques, mais aussi au niveau des glandes médullo-surrénales. Ainsi, chez ces patients hypertendus, où une concentration anormalement élevée en catécholamines est rapportée, l'administration d'antagonistes des récepteurs β -adrénergiques induit une baisse de la pression artérielle qui est reliée à une chute de la concentration plasmatique en catécholamines^{145, 153}. L'hypersensibilité β_2 -adrénergiques pré-synaptiques est suggérée comme responsable de l'hyperactivité du SNS chez ces patients hypertendus. De plus, suite à leur blocage, la stimulation α_1 -adrénergique est diminuée, expliquant l'atténuation du tonus sympathique.

Les effets induits par une plus grande libération de catécholamines sont donc observables suite à l'évaluation de leur activité au niveau post-synaptique. Il est démontré que la réactivité vasculaire impliquant les récepteurs α - et β -adrénergiques est altérée en présence d'une hyperactivité du SNS. Chez les patients souffrants d'HE, tout comme dans certains types d'hypertension expérimentale, une réactivité accrue à la suite d'une stimulation α_1 -adrénergique est observée^{155, 156}. À l'opposé, il semble que la réponse β -adrénergique est atténuée¹⁵⁷. En accord avec ces observations, la densité des récepteurs β -adrénergiques chute à l'intérieur des compartiments myocardique et vasculaire des modèles expérimentaux étudiés^{158, 159}. Quant à la densité des récepteurs α -adrénergiques, elle reste identique¹⁶⁰, expliquant le plus grand rôle fonctionnel de ces

récepteurs dans l'hypertension artérielle. Afin d'intervenir au niveau post-synaptique et bloquer l'effet vasoconstricteur associé à la libération de catécholamines, des antagonistes des récepteurs α_1 -adrénergiques ont été développés. Bien que le blocage de ces récepteurs semble correspondre à l'intervention la plus logique afin de contrer l'action du SNS dans l'hypertension artérielle, l'efficacité réelle de ces agents pharmacologiques n'a pas été aussi concluante¹⁶¹. Des effets secondaires importants ont été observés, telle une hypotension orthostatique¹⁵⁴. Ceci pourrait s'expliquer par une grande variabilité inter-individuelle de la dose thérapeutique efficace. Ces antagonistes bloquent sélectivement le récepteur α_1 -adrénergiques et empêchent l'effet hypertenseur associé à l'activation de ce récepteur. Toutefois, la concentration plasmatique en NE augmente et entraîne une stimulation accrue des récepteurs β -adrénergiques localisés au niveau cardiaque¹⁵⁴. Ainsi, le réflexe sympathique induit par ces antagonistes peut expliquer le danger d'accroître l'apparition d'événements cardiaques et suggère de limiter leur utilisation dans le traitement de l'hypertension artérielle.

La contribution du SNS dans le développement de l'hypertension artérielle est établie depuis déjà plusieurs années. Toutefois, la compréhension de l'hyperactivité du SNS demeure très complexe. Divers dysfonctionnements pré- et post-synaptiques ont été abordés, mais il demeure important de souligner que de nombreux mécanismes, au niveau cellulaire, ont été identifiés au cours des années¹⁴⁶. Ils ont permis de constater qu'au-delà des changements hémodynamiques, les altérations du SNS permettent aussi des changements de la structure cardiovasculaire. Cet aspect que constitue le dommage fait aux organes cibles induit par le SNS sera discuté au cours de la section 1.4 et compte parmi les éléments centraux de cette thèse.

1.3.5 L'endothélium et l'hypertension

Il y a environ une vingtaine d'années, Furchgott & Zawadzki ont observé pour la première fois, dans des artères isolées, que les cellules endothéliales possédaient un rôle essentiel à la relaxation induite par l'Ach¹³. Aujourd'hui, l'endothélium est considéré comme un tissu très complexe et sa découverte a généré des percées considérables, exposant le rôle central des cellules endothéliales dans la régulation des fonctions vasculaires. Comme il a été discuté plus tôt, l'endothélium joue plusieurs rôles dans la régulation du compartiment vasculaire. Bien que sa contribution au maintien du tonus vasculaire fût identifiée en premier lieu, cette structure semble hautement impliquée dans l'hémostase, dans le contrôle de la croissance de la paroi vasculaire et dans la réponse inflammatoire²³. Dans le cadre du présent travail de recherche, notre intérêt pour l'endothélium s'est circonscrit à son rôle dans le maintien du tonus vasculaire et à son implication dans le développement de l'hypertension artérielle. De plus, l'endothélium et les médiateurs qu'il produit ont été désignés comme des facteurs importants à la régulation de la structure vasculaire¹⁶². Une dysfonction endothéliale est souvent observée dans l'hypertension artérielle et cette altération semble contribuer largement au remodelage vasculaire associé à cette condition physiopathologique¹⁶³. Ce dernier aspect fera l'objet d'une prochaine section où une analyse exhaustive des plus récents travaux concernant le rôle de l'endothélium et les changements de la structure artérielle dans le développement de l'hypertension artérielle seront abordés. Un intérêt particulier sera alors accordé à la contribution de l'ET.

Les médiateurs endothéliaux vasodilatateurs

Le rôle de l'endothélium dans le maintien du tonus vasculaire implique la libération de différents médiateurs désignés sous le vocable anglais EDRF («Endothelium-derived relaxing factor»). L'endothélium synthétise et libère des agents qui génèrent un état de vasodilatation (Figure 1.8).

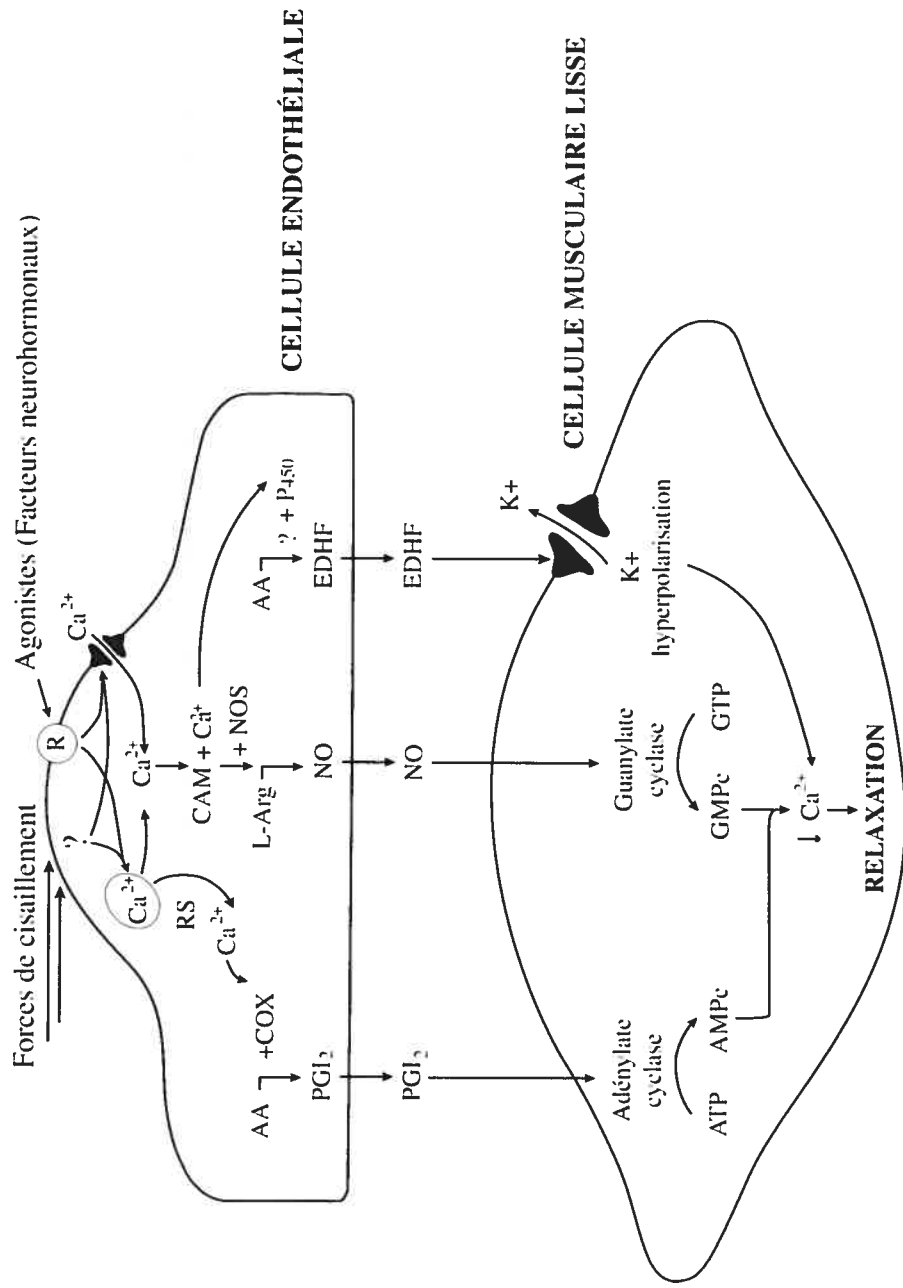


Figure 1.8 Libération de facteurs vasodilatateurs dépendants de l'endothélium
(Adapté de Vanhoutte, P.M. J of Auton Nerv Syst 81: 271, 2000)

Ils correspondent généralement au NO et à la prostacycline (PGI_2)¹⁶³. Le NO est synthétisé suite à l'activation de l'enzyme NO-synthase et de même, la formation de la PGI_2 découle de l'action enzymatique de la cyclooxygénase (COX). Un troisième facteur est généralement associé à la relaxation dépendante de l'endothélium, il s'agit de l'EDHF et est désigné en langue anglaise, «Endothelium-derived hyperpolarizing factor»¹⁶³. Bien que l'existence de cette troisième voie associée à la vasorelaxation soit clairement établie, le médiateur responsable de ce mécanisme de vasorelaxation dépendante de l'endothélium demeure mal identifié¹⁶⁴. Néanmoins, jusqu'à présent, le système enzymatique du cytochrome P-450 constitue, selon plusieurs travaux, un candidat important à la genèse de l'EDHF^{164, 165}.

Le NO est un médiateur endothélial se retrouvant sous forme gazeuse. Sa formation nécessite une augmentation de calcium intra-cellulaire qui une fois lié à la calmoduline (CAM) active l'enzyme NO synthase, responsable de la réaction catalytique (Figure 1.8). La contribution de trois substrats, correspondant à la L-Arginine, le NADPH et l' O_2 , est essentielle à cette réaction. Elle implique aussi des co-facteurs identifiés par la flavine adénine dinucléotide (FAD), la calmoduline, le BH_4 et l'hème pour finalement permettre à la NO synthase de former le NO et la citruline qui est un métabolite inactif¹⁶⁶. Le NO peut correspondre à une enzyme constitutive ou inducible. Initialement, deux isoformes de la NO synthase, soit la NOS-1 et la NOS-3, ont été respectivement identifiées aux cellules neuronales et endothéliales¹⁶⁶. Par la suite, leur localisation a été établie dans plusieurs autres types cellulaires, tel au niveau des surrénales, des mastocytes, des nerfs périphériques et des plaquettes¹⁶⁷. De plus, il existe la NOS-2 qui désigne l'isoforme inducible de la NO synthase. Bien qu'il fût énoncé plus tôt que le calcium soit essentiel à l'activité de la NO-synthase, l'activation de la NOS-2 n'implique pas le calcium¹⁶⁷. Elle produit du NO dans des conditions pathologiques et à l'intérieur d'un éventail de types cellulaires. Il peut s'agir de chondrocytes, de cellules endothéliales cardiaques, de fibroblastes, d'hépatocytes, de macrophages, de lymphocytes etc¹⁶⁷.

La NOS-3 originellement identifiée aux cellules endothéliales est présente en condition physiologique. Cet état constitutif de la NO synthase permet à des stimuli d'activer momentanément une grande production de NO. Elle diffusera dans la portion abluminale afin d'atteindre les CMLVs, mais aussi dans la portion luminale de l'artère¹⁶⁴. Les forces de cisaillements, produites par l'augmentation du débit artériel à la surface des cellules endothéliales, induisent l'ouverture de canaux calciques membranaires (Figure 1.8). L'ouverture de ces canaux est essentielle, car elle assure une augmentation intra-endothéliale en Ca^{2+} qui est essentiel à la production du NO⁵³. À l'exemple des forces de cisaillements, des agonistes induisent la production du NO en activant leurs récepteurs respectifs localisés à la membrane cytoplasmique endothéliale (Figure 1.8). Ces agonistes correspondent à l'Ach, l'histamine, l'AVP, les catécholamines, les purines, la sérotonine, la thrombine, la BK et l'ET^{141, 163}. Rapidement, le NO diffuse vers les CMLVs où il active la guanylate cyclase soluble (Figure 1.8). Cette enzyme est alors responsable de la réaction catalytique permettant, à l'aide de la guanine triphosphate (GTP), de produire le second messenger qui est le guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Successivement, ce second messenger stimule la protéine kinase G qui inhibe l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur des CMLVs¹⁶⁸. De même, le GMPc diminue l'activation de la kinase associée aux chaînes légères de myosine. Il en résulte une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de myosine, responsable de la chute de la tension développée par les CMLVs¹⁶⁸. En d'autres mots, une vasodilatation découle de l'action du NO. L'importance du NO dans la vasorelaxation dépendante de l'activation de l'endothélium varie entre les territoires vasculaires. Bien qu'il puisse contribuer dans les artères de résistance¹⁶⁹, son importance à la vasorelaxation dépendante de l'endothélium prédomine dans les artères de conductance¹⁶². Cette fonction représente la première caractéristique fonctionnelle attribuée au NO. Toutefois, il est bien connu que ce médiateur endothélial peut induire d'autres effets, telle l'inhibition de la synthèse de l'ET dans les cellules endothéliales^{170, 171}. En diffusant dans la portion luminale, le NO peut prévenir la production de molécules d'adhésion¹⁷² ainsi que bloquer l'aggrégation des plaquettes à la paroi vasculaire¹⁷³. Finalement, au niveau abluminal, le NO est un inhibiteur de la croissance des CMLVs, du moins dans les artères de gros calibres¹⁷⁴. Un dysfonctionnement endothélial semble participer au développement physiopathologique

associé à l'hypertension¹⁶⁵. Une détérioration de la fonction endothéliale implique une plus grande production de stress oxydatif qui favorise une diminution du NO et de la vasodilatation qui en découle (Figure 1.9). Bien que le NO soit un élément potentiellement important au développement de l'hypertension artérielle, le NO n'est pas d'intérêt majeur dans le cadre de la présente thèse et il ne sera pas davantage abordé.

La PGI₂ constitue un médiateur endothélial qui découle de l'activité de la COX (Figure 1.8). Bien que de la synthèse de la PGI₂ puisse se retrouver à plusieurs sites, tels aux niveaux de l'endocarde, des cellules myocardiques, des CMLs et des cellules du SNC et du SNP^{175, 176}, notre intérêt pour ce médiateur endothélial se limite à l'endothélium vasculaire. Ce sont les membranes de phospholipides retrouvées au niveau de ces cellules qui, suite à l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂), permettent la libération de l'acide arachidonique. Ce dernier substrat est essentiel à l'activité des enzymes associées à la famille des eicosanoïdes. Ce sont la COX, la lipoxigénase et le cytochrome P-450 qui catalysent la synthèse des prostaglandines, des thromboxanes, des leukotriènes et des dérivés du cytochrome P-450 désigné comme des acides époxyeicosatriénoïques (EETs). Ces eicosanoïdes impliquent un nombre impressionnant de médiateurs qui assurent la constriction et la dilatation de plusieurs tissus musculaires lisses. Ils contribuent également à moduler l'agrégation plaquettaire. Toutefois, il est essentiel de souligner que la contribution de la PGI₂ au phénomène de vasorelaxation est considérée très modeste dans la grande majorité des territoires vasculaires en condition *in vivo*.^{177, 178}

En réponse aux agonistes, tel l'Ach, la BK et la substance P, une augmentation de la concentration en Ca²⁺ intra-cellulaire est induite et accélère la formation de la PGI₂ à l'aide de l'action catalytique de la COX¹⁷⁹ (Figure 1.8). La PGI₂ ainsi formée dans l'endothélium se dirige vers les CMLVs afin de produire une activation de l'adénylate cyclase. Cette dernière est responsable de la réaction catalytique permettant, à partir de l'ATP, la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Successivement, ce second messager stimule la protéine kinase A qui met fin à la contraction des CMLVs. Son action consiste à déphosphoryler la kinase des chaînes légères de myosine, essentielle à la liaison entre la myosine et l'actine des fibres musculaires lisses¹⁸⁰. Le

Ca^{2+} qui est impliqué dans l'interaction entre la myosine et l'actine peut être repris par le réticulum sarcoplasmique. De plus, il peut quitter le cytosol par l'intermédiaire des pompes membranaires. Il en résulte une vasorelaxation.

Le troisième mécanisme associé à la vasorelaxation est identifié à l'EDHF (Figure 1.8). Il est rapporté que la relaxation du muscle lisse vasculaire implique une hyperpolarisation. Le NO et la PGI_2 , via l'activation des récepteurs K^+ dépendant du Ca^{2+} et de l'ATP, peuvent hyperpolariser le muscle lisse vasculaire^{179, 181}. Toutefois, l'hyperpolarisation prend place même en compagnie d'antagonistes de la synthèse de ces deux médiateurs endothéliaux, suggérant qu'un facteur encore mal défini participe à la vasodilatation dépendante de l'endothélium et ce, via une hyperpolarisation des CMLVs^{182, 183}.

Au cours des dernières années, on a cherché le médiateur expliquant ce phénomène d'hyperpolarisation dépendant de l'endothélium. Parmi les mécanismes candidats, la contribution de jonctions communicantes entre les cellules endothéliales et les CMLVs représentent une possibilité. Certaines évidences expérimentales soutiennent qu'une hyperpolarisation au niveau endothélial se propage vers les CMLVs à l'aide de ces connexions¹⁸⁴. À l'intérieur de la cellule endothéliale, une genèse impressionnante de médiateurs est induite et parmi ceux-ci des molécules oxydantes, tel le peroxyde d'hydrogène contribuerait à l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses¹⁸⁵. L'acide arachidonique, synthétisée dans la cellule endothéliale constitue un élément central à la production de nombreux médiateurs endothéliaux. Au nombre de ces agents produits, l'anandamide, une canabinoïde retrouvée de manière endogène, serait libérée et dirigée vers le muscle lisse afin d'hyperpolariser les CMLVs.¹⁸⁶ De plus, comme il a été précisé plus tôt, l'action du système enzymatique du cytochrome P-450 permet de produire, à partir de l'acide arachidonique, les EETs (Figure 1.8). Ces derniers ont d'ailleurs été grandement étudiés et démontrent, dans de nombreux lits vasculaires, un effet hyperpolarisant^{184, 187}. Somme toute, un tableau fort complexe découle des multiples voies pouvant expliquer l'hyperpolarisation vasculaire. Ces voies démontrent sans exception que les mêmes agonistes permettant la production du NO et de la PGI_2

peuvent aussi par l'élévation du Ca^{2+} intra-endothéliale, activer les médiateurs sous-jacents à l'hyperpolarisation¹⁷⁹.

Il demeure impossible de trancher en faveur d'un de ces mécanismes présentés. En ce sens, il est possible qu'il existe plusieurs EDHFs, car l'effet hyperpolarisant varie entre les territoires vasculaires¹⁸⁸ et les espèces animales étudiées¹⁸⁴. Néanmoins, deux éléments semblent centraux dans le mécanisme de l'EDHF. Premièrement, ce phénomène implique la participation de facteurs (électro-tonique ou médiateur endothélial) originants de l'endothélium. Deuxièmement, ils activent en grand nombre l'ouverture de canaux K^+ dépendant du Ca^{2+} ¹⁸⁴. Ainsi, l'induction de la synthèse des EETs permettrait à ces médiateurs de quitter l'endothélium et induire, par un mécanisme inconnu, l'ouverture des canaux K^+ dépendant du Ca^{2+} localisés à la membrane des CMLVs. La sortie de K^+ en direction du compartiment extra-cellulaire entraîne une hyperpolarisation des CMLVs et empêche la contraction de ces dernières. Pour des raisons méthodologiques, il demeure impossible de démontrer, *in vivo*, la contribution de l'EDHF¹⁷⁸. Toutefois, il est observé *ex vivo* que ce facteur contribue au tonus des artères de résistance humaine¹⁸⁹. Si la contribution de ce facteur est réellement importante à la vasorelaxation *in vivo*, les évidences expérimentales suggèrent que ce mécanisme soit davantage impliqué au niveau des artères de résistance qu'au niveau des artères de conductance^{179, 188}. À l'instar du NO, l'EDHF est aussi impliqué dans le développement physiopathologique associé à l'hypertension artérielle. Le NO est généralement identifié comme une voie dépendante de l'endothélium pouvant être altéré dans l'hypertension. Ainsi, L'EDHF interviendrait lorsqu'un déficit en NO serait établi, mais à son tour ce mécanisme deviendrait altéré en raison de la production accrue de stress oxydatif qui est associé à la condition physiopathologique¹⁹⁰.

Les médiateurs endothéliaux vasoconstricteurs

En présence de conditions bien spécifiques, la fonction endothéliale devient altérée. Ainsi, dans l'hypertension, à l'instar de plusieurs autres pathologies vasculaires, un dysfonctionnement endothélial prend place et implique une production significative de

médiateurs vasoconstricteurs¹⁶² (Figure 1.9). La présence accentuée de stress oxydatif, tel l'anion superoxide (O_2^-), contribue largement à cette vasoconstriction endothélium dépendante. Il semble exister une interaction entre les dérivés du stress oxydatif et le NO. Ceci peut impliquer O_2^- , l'hydroxyde d'hydrogène (OH^-) pour former le peroxynitrite (ONOO^-). Ainsi, en désactivant le NO, ces médiateurs oxydants favorisent un effet vasoconstricteur dépendant de l'endothélium¹⁶². De plus, les médiateurs du stress oxydatif atteignent les CMLVs et catalysent, à l'aide de l'acide arachidonique, la synthèse de dérivés prostanoides vasoconstricteurs^{191, 192}. Ces médiateurs sont désignés comme les endopéroxydes et correspondent essentiellement à la prostaglandine H_2 (PGH_2) et à la thromboxane A_2 (TXA_2). Ils sont produits à l'intérieur des CMLVs, mais ils quittent le cytosol vers l'espace extra-cellulaire afin de stimuler les récepteurs TP (thromboxanes/endopéroxydes) situés à la membrane cytoplasmique de ces mêmes cellules¹⁷⁸ (Figure 1.9). Cette activation réceptorielle permet l'ouverture des canaux calciques membranaires, augmentant la concentration intra-cellulaire en Ca^{2+} . Conséquemment, il y a une plus grande interaction entre les chaînes légères de myosine et les fibres d'actine, expliquant l'effet vasoconstricteur produit.

Il est important de souligner que la production de facteurs endothéliaux vasoconstricteurs semble impliquée dans l'hypertension artérielle ou dans plusieurs états vasculaires pathologiques^{52, 162}. Ainsi, il est démontré que les agonistes, induisant généralement un effet vasodilatateur dépendant de l'endothélium, tels l'Ach, la BK, les purines et la sérotonine, produisent une vasoconstriction dépendante de l'endothélium en présence d'une condition hypertensive^{162, 193} (Figure 1.9). De même, l'étirement vasculaire, les forces de cisaillement et l'hypoxie représentent des stimuli pouvant induire la production et l'activité des dérivés de la COX associés à cette réponse^{162, 194} (Figure 1.9). Selon les résultats obtenus dans les modèles d'hypertension artérielle et chez les patients atteints d'HE, il est suggéré que la production et l'activité des prostanoides vasoconstricteurs, en l'occurrence la PGH_2 et la TXA_2 , soient augmentées^{195, 196}. Ainsi, contrairement aux observations faites chez des rats témoins, la stimulation induite par des forces de cisaillements, de même que celle associée à l'Ach produisent un effet vasoconstricteur dépendant de la COX qui altère la réponse

vasodilatatrice chez des rats SHR^{162, 197}. Cet effet, associé à la production des prostanoïdes vasoconstricteurs semble se manifester dans les artères de conductance, mais aussi dans les artères de résistance, car ceci a été rapporté dans l'aorte, les artères mésentériques les artérioles perfusant les muscles squelettiques et les artères rénales^{198, 199}. Toutefois, il est important de souligner que la TXA₂ ne semble pas contribuer à l'action vasoconstrictrice associée aux prostanoïdes¹⁹⁸. L'effet induit pas l'Ach dans plusieurs préparations n'est pas modifié par les inhibiteurs de l'enzyme TXA₂ synthase, mais est inhibé par les antagonistes des récepteurs TP^{198, 199}. Ces résultats suggèrent que la plus grande expression de la COX et l'altération du métabolisme de la PGH₂ expliquent la production accrue en prostanoïdes vasoconstricteurs dans ces modèles et confirment le rôle de la PGH₂ dans la vasoconstriction dépendante de l'endothélium.

Le dysfonctionnement de la voie des prostanoïdes, associé à un effet vasoconstricteur, ne constitue pas la seule voie responsable d'une vasoconstriction dépendante de l'endothélium. L'ET qui est aussi synthétisé à l'intérieur de cette structure constitue un médiateur endothélial qui possède une action vasoconstrictrice très importante (Figure 1.9). Ainsi, dans le cadre de la présente thèse, l'ET sera grandement abordé, car des évidences récentes suggèrent que ce peptide constitue un médiateur significatif au développement physiopathologique de l'hypertension artérielle¹⁸.

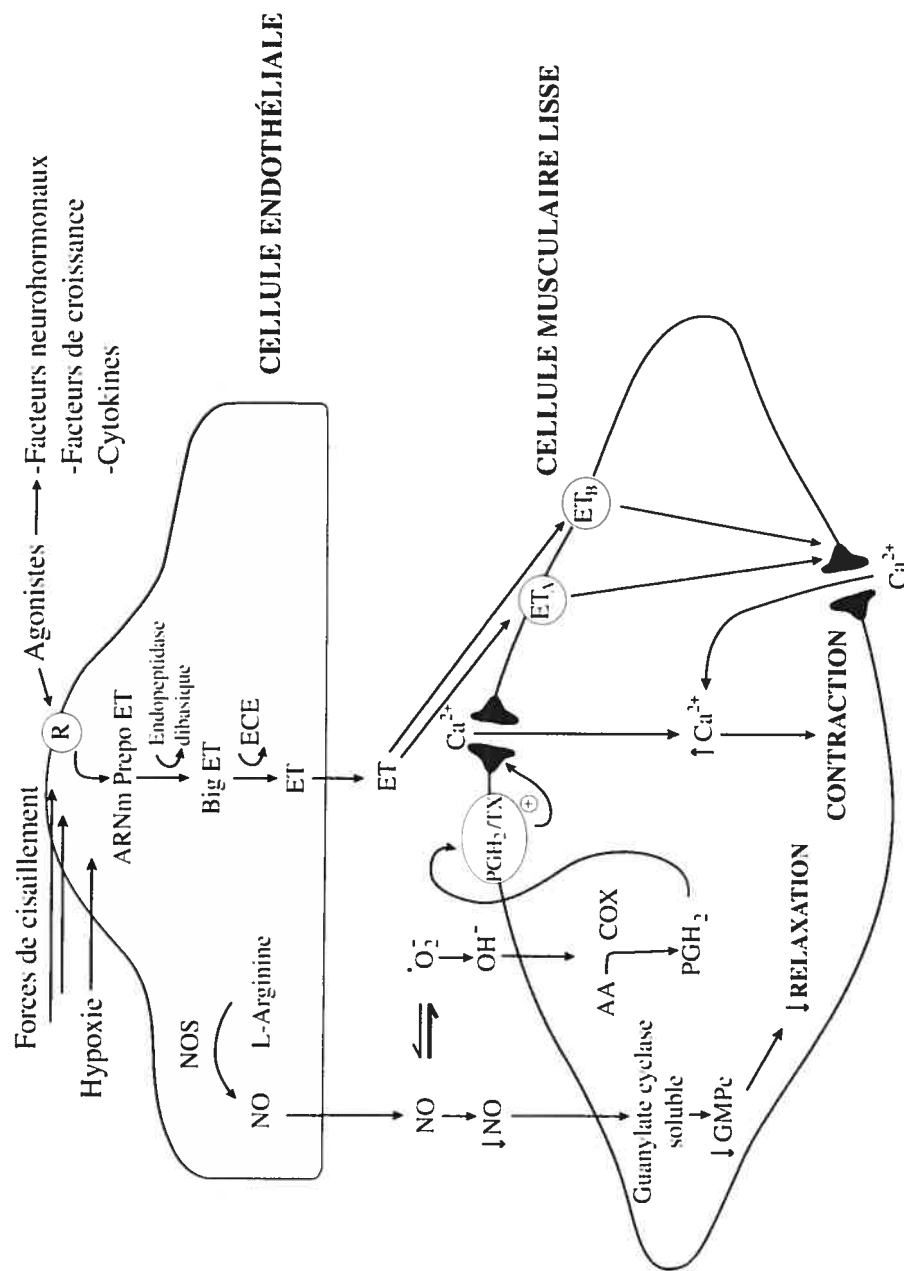


Figure 1.9 Libération de facteurs vasoconstricteurs dépendants de l'endothélium
(Adapté de Vanhoutte, P.M. *J of Hypertension* 17:1047, 1999)

1.3.6 L'endothéline, un médiateur important dans l'hypertension

La biosynthèse, la libération et la régulation de l'endothéline

L'ET constitue un peptide formé par une chaîne de 21 acides aminés. Initialement, elle a été isolée dans le surnageant provenant de cellules endothéliales en culture²⁰⁰. Cette première observation avait été effectuée à l'aide de cellules porcines, toutefois il est bien connu aujourd'hui que le gène de l'ET est hautement exprimé chez plusieurs espèces animales, de même que chez l'être humain²⁰¹. Sa production au niveau endothélial est majeure, mais pas exclusive. D'autres types cellulaires, tel les CMLVs et les cardiomyocytes peuvent aussi produire l'ET²⁰². De plus, il semble que 3 isopeptides de l'ET existent dans le génome humain²⁰¹. Il y a l'ET-1 qui est la forme la plus exprimée dans l'arbre artériel, mais aussi l'ET-2 et l'ET-3²⁰⁰. Ces trois isopeptides possèdent un très haut degré de similitude. Tous les trois isopeptides sont formés d'une chaîne de 21 acides aminés. Ils possèdent les mêmes liens intra-chaînes et une portion C-terminale hydrophobique identique. Pour les fins de notre discussion, le terme ET fera référence à l'isopeptide ET-1.

Le gène de l'ET permet, suite à la traduction de son ARNm, la formation d'un pro-peptide inactif qui est la prepro-ET. Ce peptide qui est constitué de 212 acides aminés est hydrolysé à deux sites spécifiques par une endopeptidase dibasique. Il en résulte la synthèse de la pro-ET, plus souvent désignée par le terme « big ET » qui correspond à un peptide de 39 acides aminés. Ce précurseur permet, à l'aide de l'enzyme de la famille des métallopeptidases, l'enzyme de conversion de l'ET (ECE), la formation mature de l'ET²⁰³. Ainsi, cette enzyme hydrolyse la « big ET » et produit le peptide de 21 acides aminés correspondant à l'ET²⁰² (Figure 1.9).

La libération de l'ET d'origine endothéliale semble polarisée et davantage dirigée vers la portion abluminale afin d'atteindre les CMLVs retrouvés dans la paroi artérielle^{204, 205}. Une petite fraction de l'ET libérée atteint généralement la portion luminale et peut être mesurée dans la circulation²⁰⁵. En raison de sa libération préférentielle vers la portion

abluminale, il est établi que l'ET agit davantage de manière paracrine et autocrine. Dans la section 1.3.8, les interactions s'établissant entre le SRA, le SNS et l'ET seront discutées. Il est important de souligner que tout comme l'Ang II et la NE, d'autres neurohormones, tels l'AVP et la BK stimulent l'expression de l'ARNm de la prepro-ET²⁰¹. Des facteurs de croissance, tels le « platelet growth factor » (PDGF) et l'« epithelial growth factor » (EGF), et des cytokines, tels le « tumor necrosis factor α » (TNF α) et le « transforming growth factor β » (TGF β)²⁰¹, ainsi que l'hypoxie augmentent l'expression de l'ARNm de la prepro-ET²⁰⁶. De plus des stimuli mécaniques, tel l'étirement et la diminution des forces de cisaillements modulent à la hausse l'expression de ce gène²⁰⁷. À l'opposé, l'élévation des forces de cisaillements abaisse l'expression de l'ARNm de la prepro-ET²⁰⁸. Tous ces stimuli qui modulent l'expression du gène de l'ET interviennent au niveau de la membrane plasmique endothéliale, soit suite à une interaction réceptorielle ou par l'intermédiaire de mécanismes membranaires encore incertains (Figure 1.9).

Les types de récepteurs à l'endothéline et leur localisation

Il existe deux sous-types de récepteurs à l'ET. Ce sont les récepteurs ET_A et ET_B qui font partie de la grande famille des récepteurs couplés à une protéine G et possédant 7 domaines transmembranaires²⁰⁷. L'activation post-réceptorielle, associée à ces récepteurs, enclenche une cascade signalitique qui augmentent la concentration de Ca²⁺ intra-cellulaire (Section 1.5.2). Ainsi, ce sont majoritairement des récepteurs ET_A qui sont retrouvés à la membrane des CMLVs et en proportion moindre des récepteurs ET_B (ET_{B2})²⁰⁹. À la suite de leur activation, ils permettent l'ouverture des canaux calciques et l'entrée de Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule (Figure 1.9). La fonction des récepteurs ET_B au niveau vasculaire est plus complexe que celle des récepteurs ET_A. Contrairement aux récepteurs ET_A qui sont uniquement localisés à la membrane des CMLVs, les récepteurs ET_B sont aussi exprimés au niveau des cellules endothéliales (ET_{B1}) où ils induisent un effet antagoniste à celui produit au niveau des CMLVs. En effet, l'activation des récepteurs ET_{B1} des cellules endothéliales entraîne un effet vasodilatateur qui implique une libération de NO et de PGI₂²⁰⁹ (Figure 1.8). Ainsi, lorsqu'une injection systémique

d'ET est effectuée, une hypotension transitoire prend place, suivit d'une élévation soutenue de la pression artérielle²⁰⁰. Ceci suggère que l'effet vasoconstricteur induit par l'ET prédomine sur l'effet vasodilatateur.

Un deuxième rôle est aussi attribué aux récepteurs ET_{B1} localisés à l'endothélium. Il semble bien établi que la demi vie de l'ET est d'environ 1 minute dans plusieurs modèles animaux, suggérant qu'une clairance de l'ET s'effectue rapidement²⁰². Ainsi, cette fonction est attribuée aux récepteurs ET_{B1} et permet de régulariser la concentration plasmatique d'ET. Cet effet se produit au niveau des poumons, des reins, du foie, du cœur et de la rate²⁰². Néanmoins, c'est au niveau de la circulation pulmonaire que ce mécanisme de clairance est le plus actif²¹⁰. Ce mécanisme n'est pas sans importance en clinique, car l'utilisation d'antagonistes des récepteurs mixtes ET_{A/B} a créé de vives discussions sur l'importance des concentrations plasmatiques d'ET^{211, 212}. Cet aspect du blocage du système de l'ET sera éventuellement abordé et permettra de mettre en évidence les interactions concernant l'importance de bloquer la production, l'effet et l'élimination de l'ET. Notre discussion est orientée vers le système vasculaire, toutefois il demeure important de souligner que des récepteurs à l'ET sont retrouvés au niveau cardiaque, mais aussi au niveau des poumons, du tractus gastro-intestinal, du foie, de l'urètre, des organes reproducteurs mâles et femelles, des yeux, des os, de la peau ainsi qu'au niveau d'un nombre considérable de glandes, comme les surrénales²⁰².

Les effets physiologiques de l'endothéline

La première observation du rôle fonctionnel de l'ET a permis d'établir que ce peptide constitue un puissant agent vasoconstricteur²⁰⁰. Aujourd'hui cet effet attribué à l'ET est toujours valable¹⁹, toutefois comme il sera abordé à l'intérieur de cette thèse, l'ET représente aussi un facteur de remodelage de la structure vasculaire^{19, 202, 207}. Bien qu'il demeure encore incertain si l'ET constitue un facteur de croissance (hypertrophie) ou un facteur de prolifération (hyperplasie) *in vivo*, un certain nombre d'évidences expérimentales, *in vitro*, ont démontré que l'ET pouvait induire ces deux phénomènes cellulaires^{207, 213, 214}. De plus, il a été rapporté que l'ET favorise la survie cellulaire en

inhibant les mécanismes d'apoptoses²¹⁵. Ainsi, dans le processus physiopathologique associé à l'hypertension artérielle, il semble plausible que ce peptide possède un effet trophique vasculaire égal, sinon davantage important que son effet vasoconstricteur. Ce constat associé au rôle de l'ET dans l'hypertension artérielle sera davantage abordé au cours de notre discussion concernant le rôle de l'ET dans le remodelage vasculaire (Section 1.4.4).

Avant d'aborder les différents rôles de l'ET dans le contrôle cardiovasculaire, il importe de souligner sa contribution au développement embryonnaire et fœtal. L'ET est essentiel au développement du système nerveux lors de la phase embryonnaire²¹⁶. De même, l'absence d'ET est associée à des déformations cranio-faciales lors de la naissance²¹⁷. Ces évidences suggèrent donc que l'ET contribue de manière substantielle au développement normal de l'embryon et du fœtus, suggérant que le blocage du système de l'ET pourrait s'avérer tératogène d'un point de vue thérapeutique.

L'ET est un des plus puissant vasoconstricteur connu et cet effet est relativement ubiquitaire dans le système cardiovasculaire. L'effet vasoconstricteur de l'ET se manifeste autant dans des artères de conductance que dans les artères de résistance isolées²⁰². Généralement, l'ET produit son effet vasoconstricteur à la suite de l'activation de ses récepteurs ET_A et ET_B localisés aux CMLVs. Par son action vasoconstrictrice, l'administration d'un bolus d'ET (<300 pmol) augmente la résistance périphérique totale et en conséquence entraîne une élévation significative de la pression artérielle²¹⁸. Cet effet systémique induit par l'ET s'explique par une vasoconstriction des artères alimentant la rate, l'estomac, les intestins, les reins et le pancréas. Ainsi, cet effet exogène de l'ET permet de proposer un rôle endogène à l'ET dans la redistribution du débit artériel au cours de certaines conditions de stress. En ce sens, lors de l'exercice aérobie, l'ET diminue la perfusion artérielle au niveau splanchnique afin de redistribuer le débit artériel vers les régions essentielles à la poursuite de l'activité, tels le cœur et les muscles squelettiques²¹⁹.

En plus de ces effets directs, l'ET semble contribuer à l'effet produit par les SRA et SNS²²⁰. Par exemple, une perfusion d'Ang II peut produire une élévation de la pression artérielle qui peut être potentiellement bloqué par un antagoniste du récepteur ET_A à l'ET²²¹. Néanmoins, cet effet potentiel comme la vasoconstriction directe des effets rénaux suggère que d'autres mécanismes indépendants de l'ET puissent être impliqués. Les interactions impliquant les systèmes neurohormonaux et l'ET seront éventuellement abordées, ce qui permettra de mettre davantage en évidence le rôle central de l'ET dans l'hypertension artérielle.

Dans le système cardiovasculaire, l'ET constitue un facteur stimulant pour le cœur par ses effets inotrope et chronotrope positif²²². Il peut aussi correspondre à un agent pro-arythmique en prolongeant la durée du potentiel d'action²²³. De plus, à l'instar du territoire vasculaire, l'ET est impliqué dans l'hypertrophie myocardique²²⁴. Sans énumérer toutes les fonctions de l'ET, car l'intérêt de cette thèse pour l'ET est ciblé au système vasculaire, il intervient au niveau rénal. L'ET est produit au niveau de cet organe et semble être impliqué dans le contrôle de sa perfusion²²⁵. Il module la filtration glomérulaire ainsi que la rétention hydrique et sodique dans la portion distale du néphron. De plus, un dysfonctionnement du système de l'ET est généralement associé à une diminution du débit de perfusion rénale, à une filtration glomérulaire altérée, ainsi qu'à une plus grande rétention hydrique et sodique^{202, 225}. Ces effets observés au niveau rénal peuvent donc contribuer au développement de l'hypertension artérielle. L'ET intervient aussi au niveau du cortex surrénalien en induisant la production de l'aldostérone qui représente un facteur important à la rétention hydrique et sodique²⁰². De plus, l'ET est exprimé au niveau pulmonaire et contribue à la régulation du tonus des artères et des bronches²²⁶. Finalement, l'activation du récepteur ET_B endothélial par l'ET induit une inhibition de l'aggrégation plaquettaire qui semble être reliée à une production accrue en PGI₂ et en NO²²⁷.

Le blocage du système de l'endothéline dans l'hypertension artérielle

Le système de l'ET peut devenir dysfonctionnel et participer au développement de l'hypertension artérielle et de pathologies cardiovasculaires, telles l'insuffisance cardiaque, l'hypertension pulmonaire et l'athérosclérose²¹¹. Plusieurs stratégies pharmacologiques ont été développées afin de bloquer le système de l'ET et contrer sa participation au développement de ces pathologies cardiovasculaires²²⁸. Il existe des antagonistes qui bloquent l'interaction entre l'ET et ses récepteurs ET_A et ET_B.²⁰² Le blocage du récepteur ET_B implique une particularité en raison du fait que son interaction avec l'ET, spécialement au niveau pulmonaire, induit la clairance de ce peptide²¹⁰. Cet aspect ne doit pas être négligé, car en présence d'un inhibiteur mixte ET_{A/B}, les taux d'ET circulants augmentent et pourraient, peut-être, altérer à long terme l'action de cet antagoniste^{211, 229}. De plus, il est possible d'inhiber la biosynthèse de l'ET en bloquant l'activité de l'ECE²⁰².

Il s'avère essentiel de spécifier que l'ET n'est pas impliqué dans l'augmentation de la pression artérielle de tous les types d'hypertension artérielle expérimentale²³⁰ (Tableau 1.2). Les résultats obtenus suggèrent que l'ET contribue à l'hypertension artérielle principalement dans les modèles dépendants du sel et dans le modèle d'infusion chronique à l'Ang II¹⁹. À l'instar de ces observations, de plus en plus d'évidences proposent que l'ET ne soit pas nécessairement augmenté chez tous les patients hypertendus²³¹. Ces constatations sont d'une grande importance, car ils permettent de mieux comprendre les résultats obtenus concernant l'efficacité de ces antagonistes dans le traitement de l'hypertension artérielle.

L'utilisation d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A ou l'utilisation d'un antagoniste mixte pour les récepteurs ET_{A/B} a été un sujet de débat quant à la meilleure intervention à choisir afin de traiter l'hypertension artérielle. Des études expérimentales auprès de souris invalidées pour le gène codant en faveur du récepteur ET_B démontrent une élévation de la pression artérielle^{232, 233}. Ces résultats permettent de soutenir le rôle important du récepteur ET_B dans l'homéostasie cardiovasculaire. Chez le rat, une invalidation du récepteur ET_B semble être associée à une plus grande sensibilité au sel²³⁴.

En présence d'une diète riche en sel, une augmentation de la réabsorption du Na^+ est induite lorsque le récepteur ET_B n'est pas fonctionnel et indirectement ce mécanisme produit une élévation de la pression artérielle. Le blocage du récepteur ET_B est aussi associé à une diminution de la libération du NO qui contribue à l'hypertension artérielle²³⁵. Au contraire, l'inhibition du récepteur ET_A s'avère beaucoup plus efficace que l'inhibition mixte $\text{ET}_{A/B}$ dans un modèle d'hypertension artérielle relié à une surcharge de sel²³⁶. Le blocage de ce récepteur protège donc la fonction et la structure du rein, de même qu'il induit un effet antihypertenseur plus significatif. Comme il a été discuté plus tôt, un rôle de clairance est décerné au récepteur ET_B et il en résulte qu'une inhibition spécifique de récepteur augmente les taux circulants d'ET et favorise son interaction avec le récepteur ET_A si ce dernier n'est pas suffisamment bloqué. Ainsi, ces évidences expérimentales sont concluantes et suggèrent que le récepteur ET_B ne devrait pas être bloqué dans le traitement de l'hypertension artérielle. Les antagonistes des récepteurs à l'ET sont donc en mesure d'induire un effet antihypertenseur, toutefois l'action hémodynamique de l'ET est plus modérée que son effet concernant la prévention du remodelage vasculaire²³⁶, comme il sera éventuellement discuté.

Les concentrations plasmatiques d'ET demeurent normales chez une majeure partie des patients atteints d'HE²³⁰. Toutefois, elles peuvent devenir élevées chez les patients où l'hypertension artérielle devient sévère²³⁷. De plus, l'expression d'ET est souvent plus importante dans les artères de résistance de ces derniers patients. Ces observations ont aussi été rapportées en présence de patients américains noirs qui possèdent généralement une plus grande sensibilité au sel²³¹. Ainsi, les patients démontrant une forme d'hypertension artérielle associée au sel et les patients présentant un type d'hypertension artérielle sévère devraient être les plus susceptibles de répondre à un traitement antihypertenseur avec des antagonistes des récepteurs à l'ET. Jusqu'à présent, deux études cliniques ont évalué, chez des patients hypertendus, l'efficacité de ces agents pharmacologiques. L'utilisation d'antagoniste mixte $\text{ET}_{A/B}$ (Bosentan) a d'abord été étudié chez des patients atteints d'hypertension artérielle faible à modérée et a permis d'établir une réduction de la pression artérielle équivalent à celle induite par un IECA²³⁸. Ciblant le même type de patients hypertendus, l'administration d'un antagoniste

spécifique ET_A à l'ET (Darusentan) a réduit la pression artérielle d'un ordre similaire à ce qui avait été rapporté en présence du Bosentan²³⁹. Bien que ces effets antihypertenseurs soient significatifs, il demeure que l'action antihypertenseur de ces deux types d'antagonistes pourrait présenter un bénéfice davantage substantiel dans les cas d'hypertension artérielle associée à une suractivation du système de l'ET²¹².

Le blocage de la synthèse de l'ET est aussi possible. Les premiers travaux concernant l'inhibition de la conversion de la big-ET en ET ont été effectués à l'aide du phosphoramidon, un inhibiteur de métalloprotéinases^{202, 240}. Chez le rat, il est démontré qu'une administration de phosphoramidon prévient l'élévation de la pression artérielle associée à une perfusion du précurseur de l'ET, la big-ET²⁴⁰. Bien que cet agent pharmacologique inhibe l'activité de l'ECE, cet inhibiteur n'agit pas spécifiquement pour l'ECE²⁰². Il bloque partiellement l'activité de la NEP, une métallopeptidase qui semble avoir une activité catalytique contribuant à l'inactivation de l'ET²⁴¹. Par ailleurs, cette enzyme est nécessaire à l'hydrolyse de la BK, de la substance P, de l'insuline et de l'ANF¹²⁴. En raison de cette constatation, des efforts ont été investis afin de développer un agent pharmacologique inhibiteur spécifique pour l'ECE. Bien qu'il est possible de démontrer qu'une intervention sélective pour l'ECE prévient une élévation de la pression artérielle²⁰¹, il demeure que l'ET peut être synthétisé par des chymases et des métalloprotéases qui sont indépendantes de l'ECE²²⁹. Ainsi, la synthèse de l'ET implique plusieurs systèmes enzymatiques et l'effet produit par l'inhibition de l'ECE ne représente pas un blocage complet de la synthèse de l'ET. Ces observations démontrent à quel point les différentes vasopeptidases (ECA, NEP, ECE et autres métalloprotéases) sont interreliées et qu'un inhibiteur spécifique pour l'ECE détient un potentiel thérapeutique limité comme agent antihypertenseur. Ainsi, afin d'obtenir un antihypertenseur plus efficace, un inhibiteur triple, impliquant le blocage de l'ECA, de la NEP et de l'ECE est présentement en développement¹²⁴.

1.3.7 Les interactions entre le système nerveux sympathique, le système rénine-angiotensine et l'endothéline dans le développement de l'hypertension

L'interaction entre les systèmes rénine-angiotensine et sympathique

Le SRA intervient auprès du SNS afin d'amplifier son activité. Bien qu'il existe des évidences supportant l'idée que le SRA influence l'activité du SNS au niveau central²⁴², notre discussion se limitera au SNS périphérique. L'Ang II module la neurotransmission en stimulant à la jonction pré-synaptique son récepteur AT_1 (Figure 1.7) et ainsi augmente la libération de NE dans l'espace synaptique. Cet effet est aussi présent au niveau des glandes médullo-surrénales, car chez l'animal une administration d'Ang II potentialise, via le récepteur AT_1 , la libération d'Épi et de NE lors d'une stimulation de ces glandes²⁴³. L'action facilitatrice de l'Ang II via son récepteur AT_1 a été démontrée sur la libération de NE dans plusieurs tissus, tel le cœur²⁴⁴, le muscle lisse vasculaire²⁴⁵, et le rein²⁴⁶ et ce, dans plusieurs espèces incluant l'humain²⁴⁷. De plus, l'effet facilitateur est plus important chez les rats génétiquement hypertendus SHR, en comparaison à des rats contrôles WKY²⁴⁸. L'inhibition de la recapture de la NE constitue un autre mécanisme par lequel l'Ang II peut faciliter la neurotransmission sympathique. Ce phénomène a été observé dans plusieurs tissus, mais les mécanismes sous-jacents à cette intervention ne sont pas encore bien compris²⁴². Finalement, un dernier effet de l'Ang II a été proposé au niveau pré-synaptique; l'Ang II peut augmenter la synthèse de la NE en induisant la synthèse de l'enzyme hydroxylase de la tyrosine impliquée dans la biosynthèse de la NE (Figure 1.6)²⁴².

D'autre part, la sécrétion de rénine au niveau rénal est sous l'influence du SNS. L'activité sympathique représente un des principaux mécanismes responsables de la libération de rénine via une stimulation des récepteurs β_1 -adrénergiques des cellules juxta-glomérulaires²⁴⁹. Toutefois, ce mécanisme n'est pas uniquement relié au SRA systémique, mais aussi au SRA local, car il a été démontré *in vivo* au niveau vasculaire, de même que chez l'humain²⁴⁷.

En présence d'une hyperactivité du SRA, l'influence de l'Ang II au niveau de la jonction pré-synaptique augmenterait l'activité du SNS et pourrait être délétère en contribuant à l'hypertension artérielle. Toutefois, les mécanismes sous-jacents à cette influence du SRA ne se limite pas à la jonction pré-synaptique, mais semblent aussi s'établir à la jonction post-synaptique. En effet, l'Ang II facilite la neurotransmission associée à l'activation des récepteurs α -adrénergiques. En ce sens, une faible administration d'Ang II (10^{-7} mol/l), à une préparation d'artères de résistance isolées, permet d'augmenter la réactivité vasculaire à une stimulation à la phényléphrine²⁵⁰. Il est bien démontré que l'administration d'un antagoniste AT_1 ou d'un IECA permet de bloquer l'hypertension artérielle associée à une administration de phényléphrine, un agoniste α -adrénergique²⁵¹. Ces résultats concordent avec une atténuation de la réponse contractile α -adrénergique induite par la phényléphrine suite à un blocage des récepteurs AT_1 ^{252, 253}.

Ainsi, l'action hypotensive de l'antagoniste AT_1 ne consiste pas uniquement à un blocage de l'effet direct, propre à l'activation du récepteur AT_1 , mais aussi à d'autres mécanismes tel que le blocage de l'effet potentialisateur de l'Ang II sur l'action vasoconstrictrice d'agonistes α -adrénergiques qui pourraient également être impliqués dans la réduction de la réactivité vasculaire. Cet effet de l'Ang II impliquerait une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et une élévation de l'activité de la protéine kinase C (PKC) qui potentialiseraient les mécanismes induits par la stimulation α -adrénergique²⁵⁴. De même, le NO semblerait aussi contribuer à l'action hypotensive induite lors de l'administration d'antagonistes AT_1 ²⁵⁵. La réponse vasodilatatrice à l'Ach est améliorée en présence d'une administration d'un antagoniste du récepteur AT_1 ²⁵⁶. De plus, l'absence d'endothélium altère l'effet maximal des antagonistes du récepteur AT_1 sur la réactivité contractile à la phényléphrine²⁵⁷. Ainsi, la normalisation de l'hyperactivité α_1 -adrénergique est associée à l'amélioration de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Une production accrue de radicaux libres est délétère pour la relaxation dépendante de l'endothélium. Sachant que ceci s'installe en présence d'une hypertension artérielle associée à une stimulation à l'Ang II, il est suggéré que le blocage du SRA pourrait réduire le processus oxydatif et ainsi favoriser l'amélioration des fonctions endothéliales, lesquelles viendraient contrecarrer les effets

de la stimulation du SNS²⁵⁸. De plus, sachant que le NO est impliqué dans la vasorelaxation β -adrénergique chez l'animal et l'humain²⁵⁹, une atténuation du NO, via le stress oxydatif produit par l'Ang II, pourrait expliquer la réduction de la réponse vasorelaxante β -adrénergique dans l'hypertension artérielle. Afin d'appuyer cette hypothèse, il est démontré que l'administration d'un antagoniste du récepteur AT₁ et d'un IECA permet de normaliser la relaxation β -adrénergique dans les artères de modèles expérimentaux d'hypertension²⁴².

L'interaction entre le système rénine-angiotensine et l'endothéline

L'Ang II est en mesure d'augmenter l'expression de l'ARNm de la prepro-ET. Cette induction a pu être démontrée *in vitro* en présence de différents types cellulaires^{260, 261}. De plus, *in vivo*, suite à une stimulation chronique à l'Ang II, une élévation du contenu en ET est rapportée dans la paroi de l'aorte et des artères mésentériques ainsi qu'au niveau du rein^{52, 262, 263}. Selon les observations rapportées *in vivo*, il semble que le contenu tissulaire en ET est influencé par l'Ang II endogène. En ce sens, le contenu tissulaire en ET est directement relié au contenu local en Ang II plutôt qu'à sa concentration plasmatique²⁶⁴.

Confirmant l'importance endogène de cette interaction prenant place entre l'Ang II et l'ET, il est bien démontré que le blocage du SRA dans un modèle d'hypertension rénale induit une réduction du niveau d'ET vasculaire et rénal^{265, 266}. Similairement, chez des patients hypertendus où le taux d'ET plasmatique est significativement augmenté, l'administration d'un IECA produit une chute de cette élévation plasmatique²⁶⁶. Par ailleurs, il existe aussi des évidences qui proposent une influence de l'ET quant à l'activité du SRA. Ainsi, l'ET influencerait le SRA systémique en inhibant la libération de la rénine au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire²⁶⁷. La stimulation du récepteur ET_B, permettant l'activation du NO et de la prostacycline est associée à cette action inhibitrice de l'ET. Néanmoins, une certaine réserve doit être apportée quant à l'importance réelle *in vivo* de cette influence de l'ET. Il possède avant tout une action

paracrine plutôt qu'endocrine²⁶⁸, ainsi l'influence de l'ET sur l'activité du SRA prendrait son importance uniquement lorsqu'il y a une élévation de sa synthèse locale.

Le SRA contribue à l'élévation de la pression artérielle. Il existe des évidences qui démontrent que l'Ang II participe à cet effet, entre autres via la vasoconstriction et la réabsorption de sodium au niveau du système rénal^{242, 269}. L'ET semble être impliqué dans l'effet hypertenseur de l'Ang II, car l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A prévient l'élévation de la pression artérielle²⁷⁰. Toutefois, il doit être souligné que cet effet hypotensif observé en présence d'un antagoniste du récepteur ET_A est généralement partiel^{262, 271, 272}. Une réduction d'environ 50% de la pression artérielle est observée (Tableau 1.2), suggérant que des mécanismes indépendants de l'ET contribuent à l'effet hypertensif de l'Ang II. À l'instar de ces observations rapportées à l'aide du modèle de stimulation chronique à l'Ang II, un effet hypotensif impliquant l'inhibition du récepteur ET_A a aussi été démontrée à l'aide du modèle d'hypertension rénovasculaire 2K/1C et à l'aide du modèle de rat transgénique pour le gène de la rénine (mREN2)^{273, 274}. Le modèle d'hypertension rénovasculaire 2K/1C implique une hyperactivité du SRA lors de la phase précoce du développement de l'hypertension. Seule l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A effectuée tôt, c'est-à-dire dès la mise en place du modèle d'hypertension rénovasculaire, permet de prévenir partiellement l'élévation de la pression artérielle. De même, l'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A, effectuée tôt lors du développement du modèle de rat (mREN2)²⁷, prévient l'élévation de la pression artérielle. En opposition, autant à l'aide d'un modèle d'hypertension artérielle associé à une stimulation chronique à l'Ang II qu'en présence des deux modèles transgéniques précédemment abordés, l'administration tardive d'un antagoniste du récepteur ET_A ne permet pas d'induire un effet hypotensif^{275, 276}. Ainsi, à la lumière de ces résultats, l'ET semble partiellement impliqué au développement de l'hypertension artérielle, toutefois il ne possède aucun rôle dans le maintien de cet état physiopathologique. Ce rôle précoce de l'ET à l'action de l'Ang II est majeur dans la compréhension de l'interaction qui s'établit entre ces deux facteurs. Cet aspect sera de nouveau abordé dans le contexte du remodelage vasculaire (Section 1.4.4).

Par ailleurs, l'Ang II peut induire une élévation de la pression artérielle via une vasoconstriction. Le rôle de l'ET à l'action vasoconstrictrice de l'Ang II est pratiquement inexistant dans le territoire artériel comprenant les artères de conductance. Au contraire, la contribution de l'ET à l'action de l'Ang II devient progressivement plus importante lorsque l'on atteint les artères de résistance²⁷⁷. Ceci est très important d'un point de vue fonctionnel, car la pression artérielle est contrôlée en majeure partie par la portion située en aval de l'arbre artériel. Afin de confirmer cette importance de l'ET au contrôle vasomoteur des artères de résistance chez l'humain, il est démontré que l'antagoniste du récepteur ET_A bloque l'action vasoconstrictrice associée à l'Ang II dans les artères de la micro-circulation de la peau de sujets sains²⁷⁸. De plus, il importe de souligner que la production de l'ET induite par l'Ang II permet d'amplifier l'action vasoconstrictrice associée à la NE²⁷⁹. L'action vasculaire de l'ET semble aussi impliquée dans l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. La perfusion d'Ang II altère la réponse endothéliale associée à l'action de l'Ach et suite à l'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A, la vasorelaxation dépendante de l'endothélium est normalisée²²¹. Sachant que l'Ang II induit la production locale d'ET dans les artères de résistance²⁷¹, il est suggéré que l'inhibition du récepteur ET_A favorise l'interaction entre l'ET et le récepteur ET_B retrouvé à la membrane cytoplasmique endothéliale. Il en découle une plus grande production de NO et de PGI₂ qui contribuent à la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Ainsi, le blocage du récepteur ET_A en présence d'une stimulation chronique à l'Ang II prévient une élévation de la pression artérielle qui peut impliquer différents mécanismes, tels qu'une réduction de l'effet vasoconstricteur associé à l'ET, une diminution de l'amplification de la vasoconstriction d'origine neurohumorale (NE, Ang II) par l'ET et, finalement, un rétablissement de la fonction vasodilatatrice dépendante de l'endothélium.

L'interaction entre le système sympathique et l'endothéline

L'expression de l'ARNm de la preproET est régulisée par différentes influences neuro-humorales dont les catécholamines. La première observation de l'existence de

l'ET a permis d'établir qu'une stimulation à l'Épi, via les récepteurs α_1 -adrénergiques induit l'expression de l'ET dans une préparation de cellules endothéliales²⁰⁰. Cette observation a été confirmée dans une préparation de cardiomyocytes à l'aide de la phényléphrine, un agoniste α_1 -adrénergiques²⁸⁰. *In vivo*, la stimulation à la NE a de même démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ET dans le ventricule cardiaque²⁸¹. Par ailleurs, notre laboratoire a pu observer *in vivo* une élévation du contenu vasculaire en ET suite à une stimulation chronique à la NE²⁸². Il existe donc un certain nombre d'évidences *in vitro* et *in vivo* qui supportent l'induction de l'expression de l'ET par le SNS.

D'autres part, des évidences au niveau de la jonction pré- et post-synaptique suggèrent un rôle modulateur de l'ET à l'activité du SNS. Il est rapporté que l'ET, retrouvé en concentration nécessaire afin d'induire une vasoconstriction dans une préparation d'artères de résistance isolée, inhibe l'effet vasoconstricteur produit par une stimulation à la NE²⁸³. De plus, cette observation a été rapportée en présence d'une stimulation électrique²⁸⁴, suggérant un effet inhibiteur de l'ET au niveau de la jonction pré-synaptique²⁸⁵. Au contraire, l'administration d'une faible concentration d'ET amplifie l'effet vasoconstricteur produit par une stimulation exogène à la NE, suggérant un effet facilitateur de l'ET à la jonction post-synaptique^{283, 285}. L'effet amplificateur post-synaptique de l'ET a été rapporté dans plusieurs travaux sur des artères de résistance et de conductance animales et humaines^{286, 287}. Il est proposé que l'ET augmente l'entrée de calcium à l'intérieur des CMLVs et sensibilise les protéines contractiles via l'activation de la PKC^{285, 286}. Cet effet de l'ET prend place autant dans des artères obtenues de modèles de rats hypertendus que dans des artères obtenues de rats contrôles^{287, 288}. De plus, la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B semble participer à cette amplification de l'ET dû à l'effet vasoconstricteur induit par une stimulation à la NE. La contribution de ces deux récepteurs varie en fonction de la souche de rat et du modèle expérimental d'hypertension artérielle. Par ailleurs, confirmant l'importance du rôle local de l'ET à l'action hémodynamique de la NE, ce phénomène a été observé dans la microcirculation de la peau de volontaires sains de manière non-invasive. Les résultats obtenus ont permis de constater qu'une administration locale d'un antagoniste du récepteur ET_A, mais pas

d'un antagoniste ET_B , bloque l'action vasoconstrictrice produite par une stimulation à la NE²⁷⁸. Ainsi, bien qu'il existe des évidences suggérant un rôle de l'ET à la vasoconstriction produite par la NE, il demeure difficile de bien démontrer que l'ET, via son rôle amplificateur de la réactivité vasculaire, contribue à l'élévation de la pression artérielle associée à la NE.

1.3.8 Les différents types d'hypertension artérielle

Hypertension essentielle

L'HE atteint 25-35% des adultes peuplant les pays industrialisés²⁸⁹. Elle est d'autant plus importante, car 90% des patients hypertendus sont atteints d'HE²⁹⁰. Encore mal compris, ce type d'hypertension artérielle est d'origine multifactorielle. Il est suggéré que des prédispositions génétiques favoriseraient l'augmentation de la pression artérielle en interagissant avec des facteurs environnementaux, tels l'alcoolisme, le tabagisme, l'embouppoint, une diète riche en sodium et faible en potassium ainsi qu'en calcium, le vieillissement, le sédentarisme, le statut socio-économique et le stress²⁹⁰.

Au cours du dernier siècle, plusieurs mécanismes impliqués dans le développement de l'HE ont été identifiés et ont permis de mieux comprendre cette pathologie qui demeure encore aujourd'hui fort complexe et chargée d'interrogations²⁹¹. Le sodium représente un facteur très important au développement de l'hypertension essentielle. Environ 30-50% des patients atteints d'HE possèdent une sensibilité accrue au sodium²⁹². Une diète riche en sodium, de même qu'un défaut génétique peut être à l'origine d'une balance sodique positive²⁹¹. Une plus grande concentration sodique, induite de quelques façons, peut influencer directement la résistance périphérique. Les mécanismes sous-jacents à cet effet du sodium demeurent encore nébuleux, toutefois un lien avec l'activation du SNS semble exister.²⁹² Entre autre, il est observé qu'une balance sodique positive amplifie l'effet de la vasoconstriction induit par la NE et par l'Ang II au niveau des artères de résistance^{291, 293}. L'action du SNS n'est pas considérée comme une cause au

développement de l'HE, néanmoins l'hyperactivité du SNS participe largement au développement de cet état²⁹⁴. Après plusieurs années, certains patients hypertendus présentent des taux plasmatiques de NE normaux^{290, 295}. Environ 40% des patients hypertendus sont atteints par l'HE, suggérant que le SNS contribue à son développement, mais pas à son maintien. Ainsi, d'autres facteurs doivent aussi être responsables de la présence de l'HE.

Un rôle majeur est accordé au SRA dans le développement de l'HE²⁹¹. En bref, on s'accorde pour affirmer qu'une vasoconstriction des petites artères périphériques est à la base de ce type d'hypertension artérielle, expliquant la résistance artérielle périphérique accrue. Tout comme le SNS, le SRA participe à cette augmentation de la résistance périphérique²⁹¹. De plus, ces deux systèmes interagissent entre eux²⁹⁶. Certains auteurs proposent même que le SRA constitue l'élément le plus en aval dans les interactions physiopathologiques impliquées dans le développement de l'HE^{9, 291, 297, 298}. Ainsi, afin d'appuyer ce rôle, il est démontré que la structure modifiée des artères de résistance en présence d'HE se normalise suite au blocage du SRA⁹. À l'instar des antihypertenseurs associés au SRA, le blocage du SNS permet de normaliser la pression artérielle, mais ne rétablit pas la structure artérielle¹⁰.

En condition physiologique, certains facteurs peuvent s'opposer aux mécanismes d'augmentation de la pression artérielle et de la rétention sodique²⁹¹. Parmi ces derniers, on retrouve le facteur natriurétique auriculaire (ANF), l'AVP, la BK et le NO. Un dysfonctionnement de ces éléments pourrait participer à l'établissement de l'HE. Bien que peu de travaux aient été initiés afin de mieux comprendre les interactions entre ces facteurs et le développement de l'HE, des informations chez l'humain sont davantage disponibles concernant la dysfonction endothéliale dans cette condition hypertensive²⁹⁹. Contrairement à l'athérosclérose, où la dysfonction endothéliale précède les changements de la structure artérielle, le phénomène contraire semble s'établir dans le développement de l'HE³⁰⁰. L'altération de la fonction endothéliale ne demeure toutefois pas un processus obligatoire à la mise en place de cette condition hypertensive³⁰¹. Des résultats très variables ont été observés en présence d'HE et chez plusieurs patients la

fonction endothéliale est préservée²⁹⁹. La dysfonction endothéliale serait en fait secondaire. Selon certaines données provenant du laboratoire du Dr Schiffrin, 60% des patients atteints d'HE présentent une dysfonction endothéliale²⁹⁸.

Le développement de l'HE est associé à de nombreux facteurs. Il peut impliquer le SRA, le SNS, l'endothélium et le sel. L'importance de chacun d'entre eux est variable d'un individu à l'autre, expliquant la grande complexité des interactions entre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de cet état pathologique.

Hypertension secondaire

L'hypertension secondaire désigne tous les types d'hypertension artérielle possédant une cause connue. Toutefois, l'hypertension rénovasculaire constitue le type d'hypertension secondaire le plus commun³⁰². Généralement, une sténose de l'artère rénale est à l'origine du développement de ce type d'hypertension artérielle. Elle peut être corrigée de façon chirurgicale, par angioplastie. Néanmoins, l'utilisation de traitements pharmacologiques, comme les IECA, améliore de façon significative cette condition pathologique³⁰³. Les patients atteints d'athérosclérose peuvent développer une sténose d'une ou des deux artères rénales se traduisant par une diminution du débit de perfusion rénal. D'autres manifestations pathologiques, comme la présence de cellules tumorales comprimant l'artère rénale ainsi qu'une sténose suite à une transplantation rénale représentent des causes de développement d'hypertension rénovasculaire³⁰⁴.

Le SRA est la pierre angulaire dans l'établissement de cette condition physiopathologique³⁰². En présence d'une sténose de l'artère rénale, la pression de perfusion rénale chute. Conséquemment, une plus grande production de rénine est induite au niveau du rein et suite à la cascade de réactions enzymatiques décrites plus tôt, il y a une formation accrue d'Ang II. Cet agent provoque la constriction de l'artériole efférente et ainsi normalise la filtration glomérulaire qui est altérée dans cette condition³⁰². Toutefois, le rétablissement de la fonction rénale est effectué au prix d'une hypertension artérielle systémique. L'Ang II circulant produit un effet vasoconstricteur

direct et indirect ou les interactions neurohumorales, mais aussi stimule la sécrétion d'aldostérone. Cette hormone atteint les tubules rénaux et induit une rétention de sodium et d'eau libre. Dans la phase aiguë de l'hypertension rénovasculaire, le SRA est activé afin de remédier à la baisse de pression de perfusion rénale, mais à long terme, suite à l'élévation de la pression de perfusion rénale, l'activité de la rénine plasmatique revient à la normale dans la circulation^{305, 302, 304}.

Il est bien connu qu'il existe un SRA systémique et tissulaire³⁰². Le SRA intrarénal persiste généralement et explique la présence de taux locaux élevés d'Ang II, contribuant au maintien de l'hypertension rénovasculaire dans la phase chronique. L'activité locale du SRA semble dépendre de la gravité et de la durée de la sténose. À long terme, la rétention hydro-sodée constitue le facteur majeur et responsable du maintien de l'hypertension rénovasculaire. Bien qu'une rétention sodique et une augmentation du volume extra-cellulaire produisent une baisse de l'activité du SRA, le maintien d'une perfusion rénale altérée empêche le réajustement de l'équilibre hydro-sodé et assure la conservation de l'état hypertensif. D'autres facteurs participent aussi au maintien de ce type d'hypertension artérielle. L'hypersécrétion de l'aldostérone, l'hyperactivité sympathique et la dysfonction endothéliale prennent place et semblent impliquées dans l'évolution de cet état pathologique^{129, 305, 306}.

L'hypertension secondaire comprend plusieurs autres manifestations. L'insuffisance rénale et les nombreux problèmes associés à une altération de la fonction du rein produisent inévitablement une hypertension artérielle. Des conditions physiopathologiques, moins courantes, liées à un dysfonctionnement des glandes surrénaliennes entraînent aussi une hypertension artérielle³⁰⁷. Dans plusieurs de ces cas, une ablation des glandes surrénales permet de remédier au problème. La présence de cellules tumorales, au niveau de cellules chromaffines, constitue une autre condition d'hypertension secondaire. Cette dernière induit une production supranormale de catécholamines qui est responsable de la pression artérielle anormalement élevée³⁰⁸. Ce phénomène physiopathologique, appelé phéochromocytome émerge généralement au niveau des glandes médullo-surrénales³⁰⁹. Toutefois, des amas de cellules tumorales

d'origine chromaffines peuvent aussi se retrouver à différents sites anatomiques, soit à l'abdomen, au pelvis, au thorax ainsi qu'à la hauteur du cou³⁰⁸. L'intervention chirurgicale impliquant l'ablation de ces amas de cellules tumorales permet de remédier à l'hypertension artérielle. Cette intervention est nécessaire, car cette présence supranormale de catécholamines dans la circulation peut avoir un impact négatif au niveau cardiovasculaire et même entraîner la mort³⁰⁸. Le syndrome ovarien polycystique, une coartation de l'aorte, l'apnée du sommeil et la grossesse chez la femme constituent aussi des conditions qui peuvent entraîner une élévation de la pression artérielle³¹⁰. Dans certaines de ces situations, la surcharge pondérale est grandement impliquée dans la genèse de l'hypertension artérielle. Ceci est le cas pour le syndrome polycystique et l'apnée du sommeil. Toutefois, l'hypertension artérielle associée à la femme enceinte reste encore mal comprise, mais transitoire. Suite à l'accouchement, la résistance périphérique chute et la pression artérielle revient à la normale.

Hypertension systolique isolée

L'HSI représente aussi un type d'hypertension artérielle. Elle est généralement associée au vieillissement⁶⁷ et s'explique principalement comme une conséquence de l'augmentation de la rigidité de l'aorte. Ainsi, une augmentation significative de la PAS et de la PP sont observées. La PAM reste généralement normale, suggérant que la cause de ce type d'hypertension ne soit pas principalement reliée à la résistance périphérique. En fait, une chute de la PAD est même observable et constitue une caractéristique associée à une plus grande rigidité aortique⁶⁸. On estime que la PP est influencée par l'éjection ventriculaire, la rigidité vasculaire et le temps de l'onde de réflexion⁶⁹. Sachant que l'éjection systolique reste relativement stable ou diminuée légèrement avec le vieillissement et que la PAM demeure normale ou légèrement augmentée chez ces patients, la rigidité des artères de conductance représente le facteur déterminant de l'augmentation de la PP⁶⁹. Avec le vieillissement, il a été démontré que les gros troncs artériels deviennent plus rigides. Ce changement de la compliance aortique semble s'expliquer par des altérations de la structure vasculaire qui affectent les propriétés visco-élastiques, essentielles à l'amortissement de l'onde systolique de pression⁶¹. En

condition physiologique, les propriétés élastiques de l'aorte permettent au débit sanguin pulsatile, produit lors de l'éjection systolique, d'être amorti et d'être transformé en un débit sanguin plus continu. Avec l'âge, l'aorte perd ses qualités élastiques ce qui altère significativement la perfusion périphérique. De plus, l'atténuation de l'effet tampon de l'aorte lors de l'éjection systolique crée indirectement une chute de la pression diastolique. Sachant que les artères coronaires sont essentiellement perfusées au cours de la phase diastolique, les risques de développer une ischémie cardiaque sont augmentés.

Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HP) n'est pas définie comme un type d'hypertension artérielle. Ce type d'hypertension se caractérise par une élévation de la pression artérielle pulmonaire (PAP) supérieure à 25 mmHg au repos et supérieure à 30 mmHg à l'effort³¹¹. Généralement l'HP est identifiée sous deux formes. Elles comprennent l'hypertension pulmonaire d'origine primaire (HPP) et l'hypertension pulmonaire d'origine secondaire (HPS). L'HPP est une pathologie rare qui atteint environ 1 à 2 personnes sur un million. L'étiologie de l'HPP est idiopathique. Toutefois, il est proposé que cette forme d'HP soit héréditaire et sporadique³¹². La deuxième forme d'HP est d'origine secondaire, c'est-à-dire que son développement est conséquent à une cause connue. Ce type d'HP peut correspondre à un problème circonscrit aux poumons, toutefois il peut émaner d'un problème systémique comme l'insuffisance cardiaque³¹¹.

Sans être en mesure de déterminer le facteur initiateur de l'HP, la fonction endothéliale des petites artères pulmonaires est significativement altérée dans cette condition³¹³. Des taux anormalement élevés d'ET et de sérotonine sont retrouvés dans les poumons des patients atteints d'HP³¹⁴. Une dépression de médiateurs vasodilatateurs (NO, prostacycline)³¹³ est généralement présente. De même, le dysfonctionnement endothélial implique une sécrétion accrue de TXA₂ qui stimule l'aggrégation plaquettaire et ainsi la formation de thrombus³¹⁵. Il est bien établi que l'endothélium est essentiel au contrôle vasomoteur. Toutefois, au-delà des altérations de la fonction vasomotrice de l'endothélium, de nombreux efforts de recherche ont permis d'observer une

transformation complète de la structure des petites artères pulmonaires dans ce type d'hypertension³¹⁶. Les cellules endothéliales, autant en présence d'HP primaire que secondaire, sont désorganisées ainsi que dysfonctionnelles. Une prolifération et une croissance cellulaires sont favorisées dans la paroi de ces artères; un remodelage vasculaire prend place et il se caractérise par une fibrose intimale, une hypertrophie médiale, une prolifération matricielle au niveau de l'adventice et une réduction de la lumière vasculaire³¹².

Bien que l'HP ne constitue pas l'objet de cette thèse, il importe d'insister sur le fait que l'ET représente un acteur très important au développement de cette condition physiopathologique. Les patients atteints d'HPP et de formes diverses d'HP présentent une expression très importante d'ET dans plusieurs régions des poumons³¹⁷. Cette présence est grandement associée aux cellules endothéliales des artères pulmonaires où une augmentation significative de l'épaisseur de la portion médiale vasculaire, de même qu'une fibrose de l'intima est induite³¹⁷. La concentration en ET est aussi très bien reliée au degré de la résistance vasculaire pulmonaire³¹⁷. Ainsi, L'ET par son action via ses récepteurs ET_A et ET_B contribue aux changements fonctionnels et structurels des artères pulmonaires dans le développement de l'HP. De plus, le blocage mixte des récepteurs ET_{A/B} a démontré des résultats très bénéfiques chez les patients atteints de ce problème^{318, 319}. Ils permettent d'améliorer les symptômes, la capacité fonctionnelle, les valeurs hémodynamiques et le fonctionnement cardiaque. La morbidité associée à cet état pathologique est aussi diminuée. L'utilisation d'antagoniste mixte ET_{A/B} s'avère très efficace dans le traitement de cette pathologie et constitue aujourd'hui la seule indication pour laquelle les antagonistes des récepteurs à l'ET sont utilisés dans le contexte de la clinique.

1.4 L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE ET LE REMODELAGE VASCULAIRE

L'hypertension est un processus physiopathologique qui implique plus qu'une simple élévation de la pression artérielle. Comme il a été discuté au cours de la section

précédente, le développement de l'hypertension artérielle peut être le résultat d'une altération du SNS et du SRA. De même, des atteintes endothéliales peuvent contribuer au développement de cet état. Des prédispositions génétiques sont, chez de nombreux patients à la base de l'hypertension artérielle et des facteurs environnementaux autant que de mauvaises habitudes de vie contribuent à son développement. Somme toute, la complexité de l'hypertension artérielle permet de constater que ce problème, s'il n'est pas bien contrôlé, engendre des changements importants de la structure vasculaire qui ne font que détériorer davantage la condition des patients hypertendus. Bien que ceci reste controversé, il est souvent affirmé que le remodelage vasculaire est une conséquence au développement de l'hypertension artérielle et ce processus contribuerait au maintien de la pression artérielle élevée. Le territoire vasculaire s'adapte aux changements de pression, mais aussi aux changements neurohormonaux. Dans ce contexte, la structure vasculaire se reconfigure de façon bien spécifique d'une région vasculaire à l'autre³²⁰. Il est bien établi qu'une augmentation chronique de la pression artérielle induit de façon directe un remodelage vasculaire afin de normaliser la tension dans la paroi artérielle³²¹. Toutefois, Les SRA, SNS et l'endothélium contribuant au développement de l'hypertension, peuvent aussi participer, indépendamment de leurs effets hémodynamiques, au remodelage de la structure vasculaire^{231, 282, 322}. L'objectif de la prochaine section est de décrire les influences de l'Ang II, la NE et l'ET dans le remodelage vasculaire hypertrophique. De plus, des interactions bien précises qui s'établissent entre chacun de ces facteurs seront aussi abordées et permettront de bien mettre en évidence la complexité du remodelage vasculaire hypertrophique.

1.4.1 Les types de remodelage vasculaire

Le remodelage eutrophique

L'hypertension essentielle est associée à un changement de la structure des artères de résistance. La structure de ces artères se modifie et le phénomène est identifié comme étant un remodelage eutrophique (Tableau 1.1). Ce type de remodelage se définit comme un réarrangement vasculaire sans augmentation du contenu de la paroi, accompagnée d'une diminution de la lumière vasculaire³²⁰. L'aire de section reste identique, toutefois le rapport média/lumière devient plus important³²³. Bien que l'épaisseur de la paroi vasculaire augmente, la grosseur des CMLVs retrouvée dans la couche médiale reste inchangée³²⁴. Ceci explique l'absence d'hypertrophie de la paroi vasculaire et confirme l'idée que le remodelage des artères de résistance dans l'HE correspond bien à un réarrangement du contenu cellulaire pariétal autour d'une lumière réduite. Les mécanismes responsables du remodelage eutrophique demeurent mal compris et hypothétiques. Une augmentation de l'activité neurohumorale, généralement associée au SNS et au SRA, permet une vasoconstriction des artères de résistance. Il en découle une élévation de la résistance périphérique et conséquemment une augmentation de la pression artérielle³²⁵. Il semble que cet état de vasoconstriction soit à l'origine du remodelage des artères de résistance. Ainsi, l'état de vasoconstriction initiale qui réduit le diamètre externe est maintenu et l'artère subit un remodelage de sa structure au détriment de la lumière vasculaire³²⁰. Bien que le SNS puisse contribuer à la vasoconstriction initiale, les travaux les plus récents suggèrent un rôle important de l'hyperactivité du SRA dans ce type de remodelage²⁹⁷. Les mécanismes cellulaires impliqués demeurent encore mal compris, toutefois, ils pourraient inclure une combinaison de mécanismes apoptotiques et de mécanismes de croissances cellulaires²⁶.

Chez le rat, une altération volontaire de la synthèse du NO, suite à l'administration de L-NAME, induit un effet vasoconstricteur et constitue un modèle expérimental de remodelage eutrophique³²⁶. Les artères de résistances adoptent un état de constriction, car le NO qui contribue généreusement à la réduction du tonus des artères de résistance

n'est plus présent afin d'induire un effet vasodilatateur¹⁶⁸. La pression artérielle s'élève et l'état de vasoconstriction normalise la tension pariétale. Conséquemment, et à plus long terme afin de conserver cette tension normale, la structure des artères de résistance se réorganise autour d'une lumière réduite³²⁶. Ce phénomène caractérisant les artères de résistance dans l'hypertension essentielle est ainsi reproduit dans ce modèle. Toutefois, au niveau artériolaire, ce phénomène eutrophique a aussi été observé dans le modèle d'hypertension rénovasculaire 1K/1C et dans les artères mésentériques du modèle de rat 2K/1C^{321, 327} (Tableau 1.1). Le remodelage eutrophique permet de normaliser en permanence la tension pariétale sans qu'une synthèse accrue s'effectue au sein de la paroi vasculaire^{328, 329}. De plus, la réorganisation au sein de la paroi vasculaire pourrait impliquer des changements d'interactions entre certaines cellules d'adhésions et la matrice extra-cellulaire³³⁰. Des travaux supplémentaires doivent être poursuivis afin de mieux définir les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Le remodelage eutrophique ne sera pas discuté davantage. Bien qu'il constitue un changement de structure relié à un type important d'hypertension artérielle, l'objectif de cette thèse est de mettre en valeur le rôle central de l'ET dans le remodelage impliquant une hypertrophie de la paroi vasculaire. D'ailleurs l'ET n'est pas impliqué dans le remodelage eutrophique des petites artères de résistance¹⁹.

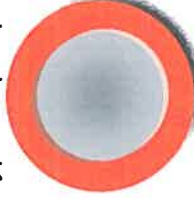
Types de remodelage



Eutrophique



Hypertrophique



dirigé vers l'extérieur
ou expansif

Modèles	Aire de section	Média	Lumière	Types d'artère	Références
SHR		↑	↓	Mésentérique	Intengan et al. 1999
L-NAME	↔	↑	↓	Basilaire / Mésent	Moreau et al. 1998
Goldblatt 2K/1C		↑	↓	Mésentérique	Deng et al. 1991
Goldblatt 1K/1C		↑	↓	Artériole	Hashimoto et al. 1987
Ang II				Mésentérique	Virdis et al. 2002
Ang II				Aorte	Herizi et al. 1998
SHR	↑	↑	↓	Mésentérique	Intengan et al. 1999
SHR	↑	↑	↓	Aorte	Otsuka et al. 1998
Goldblatt 1K/1C				Mésentérique	Deng et al. 1991
Doca-sel				Mésentérique	Intengan et al. 1999
Dahl-SS				Basilaire	d'Uscio et al. 1997
SHR-SP				Artériole cérébrale	Chillon et al. 1996
Norépinéphrine				Mésentérique	Dao et al. 2001
Norépinéphrine				Aorte	Dao et al. 2001
L-NAME	↑	↑	↔	Aorte	Simko et al. 2004
Dahl-SS				Mésentérique	d'Uscio et al. 1997
Aldostérone				Mésentérique	Park et al. 2001
Doca-sel				Aorte	Karam et al. 1996
Ang II				Basilaire / Mésent	Moreau et al. 1997
Augment. du débit				Carotide	Tronc et al. 1996
Exercice aérobie				Fémorale	Dinenno et al. 2001
Warfarine/vit K	↑	↑	↑	MCA (art cérébrale)	Dao et al. 2002
Vieillessement				Mésentérique	Laurant et al. 2004
SHR				Aorte	Giummelly et al. 1999
Goldblatt 1K / 1C				Aorte	Dobrian et al. 1999
Endothéline				Mésentérique	Dao et al. (en révision)

Tableau 1.1 Remodelage vasculaire

Le remodelage hypertrophique

Une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire associée à une synthèse accrue de son contenu est observée en présence de certaines formes d'hypertension artérielle. Ces changements de la structure vasculaire correspondent au remodelage hypertrophique (Tableau 1.1). La paroi vasculaire s'hypertrophie, la lumière diminue, reste identique ou même augmente³³¹. Enfin, le rapport média/lumière devient plus important et l'aire de section augmente significativement. Cette modification de la structure artérielle est souvent identifiée à un effet hypertrophique de la paroi artérielle, toutefois une nuance doit être apportée à cette terminologie. D'un point de vue cellulaire, l'induction d'une synthèse protéique peut prendre place au sein de la paroi artérielle et définit le phénomène d'hypertrophie cellulaire³³². De plus, associé à ce phénomène, une synthèse accrue en ADN permet de produire une hyperplasie cellulaire^{325, 332}. Il est généralement accepté que l'augmentation de l'aire de section des artères de conductance peut comprendre une hyperplasie ou une hypertrophie cellulaire³³². Dans la paroi des artères de résistance, il est proposé que l'hypertrophie cellulaire explique l'augmentation de l'aire de section.³³² Toutefois, des résultats récents ont été obtenus par notre laboratoire et proposent que l'hyperplasie cellulaire puisse aussi être impliquée dans le remodelage hypertrophique des artères de résistance³³³.

Les artères de conductance sont dépourvues de réflexe myogénique et de capacité à se contracter et afin de normaliser l'augmentation de la tension circonférentielle, un remodelage hypertrophique de la paroi vasculaire s'établit suite à une élévation de la pression artérielle³³⁴. Ainsi, dans le modèle d'hypertension artérielle induit suite à l'inhibition de la NO synthase tout comme dans l'HE, l'aorte subit un remodelage hypertrophique³²⁶ (Tableau 1.1). Sachant que le NO module la croissance de CMLVs dans des conditions *in vitro*¹⁷⁴, il est indéniable que le remodelage hypertrophique aortique induit en présence de L-NAME puisse impliquer un effet direct associé à l'inhibition de la synthèse de NO³³⁵.

Le remodelage hypertrophique implique aussi les artères de résistance³²⁵ (Tableau 1.1). Chez des patients atteints d'hypertension essentielle qualifiée de modérée à sévère,

d'hypertension secondaire, d'hypertension associée à l'acromégalie et en présence de diabète non-dépendant de l'insuline un remodelage hypertrophique des artères de résistance est observé³³⁶⁻³³⁹. Il est plausible de prétendre que des concentrations majeures de médiateurs neuroendocriniens sont sécrétées dans ces conditions hypertensives. De façon chronique, l'action de l'Ang II, de la NE et de l'aldostérone contribue à l'hypertrophie de la paroi autant au niveau des artères de conductance qu'au niveau des artères de résistance (Tableau 1.1). L'action de la pression artérielle reste toutefois non négligeable. Il est bien démontré que l'action directe de la pression artérielle peut enclencher des mécanismes cellulaires impliqués dans la synthèse protéique vasculaire et permettre un remodelage vasculaire hypertrophique^{334, 340}. Somme toute, des évidences de plus en plus importantes laissent croire que des facteurs indépendants de la pression artérielle contribuent de façon substantielle au déclenchement du remodelage hypertrophique^{271, 282, 332, 341}.

Les modèles expérimentaux, tel celui de rat SHR³⁴², DOCA-sel³⁴³, Dahl sensible au sel²⁶³ et SHR-SP³⁴⁴ développent un remodelage vasculaire hypertrophique associé à l'hypertension (Tableau 1.1). Le modèle d'hypertension rénovasculaire 1K/1C³²⁷ présente aussi ce type de remodelage. De même, lors de la phase tardive du modèle rénovasculaire 2K/1C, il est suggéré qu'un remodelage hypertrophique des artères de résistance s'installe³⁴⁵. L'Ang II, la NE, l'ET, l'aldostérone et la vasopressine sont largement sécrétées dans de nombreux types d'hypertension secondaire, et expérimentalement la stimulation chronique par ces hormones a permis de confirmer leur rôle prépondérant dans le remodelage vasculaire hypertrophique^{271, 282, 346, 347}.

Jusqu'à présent, il est soutenu que le remodelage vasculaire est un processus adaptatif plutôt qu'un événement initial responsable de l'élévation de la pression artérielle. Dans ce contexte, la pression artérielle pourrait contribuer à l'initiation du remodelage vasculaire hypertrophique, tout comme il a été proposé plus tôt que le processus pourrait être indépendant de l'élévation de la pression artérielle et impliquerait des facteurs neurohumoraux^{271, 282}. Contrairement au remodelage eutrophique secondaire à une vasoconstriction initiale, le remodelage hypertrophique se produirait principalement

dans des situations pour lesquelles l'élévation de la pression artérielle n'est pas secondaire à une vasoconstriction. Toutefois, une question demeure sans réponse. Est-ce que le remodelage vasculaire hypertrophique contribue au maintien de l'hypertension artérielle ? Bien qu'il demeure difficile de préciser avec exactitude l'importance du remodelage dans la condition hypertensive, il est toutefois de plus en plus clair que le remodelage vasculaire, en limitant la perfusion des organes cibles, tel le cœur, le cerveau et le rein, contribue aux dommages de ces derniers³²⁵.

Le remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur ou expansif

Le remodelage hypertrophique artériel qui correspond à une élévation de l'aire de section du vaisseau peut aussi être associé à une augmentation de l'épaisseur de la paroi et du diamètre luminaire vasculaire (Tableau 1.1). Ce changement de la structure vasculaire est désigné comme étant un remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur (outward)³³¹. Ce type de remodelage a d'abord été observé dans la veine œsophagienne de lapin en présence d'une hypertension de la veine porte³⁴⁸. De plus, suite à une élévation de la pression artérielle, le remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur prend aussi place chez des rats SHR et 1K/1C^{349, 350}. En raison de l'absence de réflexe myogénique, l'aorte modifie sa structure afin de normaliser l'augmentation de la tension pariétale induite par la grande pression artérielle. Dernièrement, des travaux *in vivo* en présence d'HSI et suite à l'effet du vieillissement ont permis de confirmer l'existence de ce type de changement de structure dans les artères de résistance^{351, 352}. Dans ces conditions, la PP est augmentée significativement et semble responsable du remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur. Les petites artères de résistance s'adaptent donc à l'élévation de la PP. Il est à noter que dans ces modèles la PAM n'est pas augmentée ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la lumière vasculaire.

Une élévation chronique du débit sanguin peut aussi induire un remodelage au niveau des artères de conductance qui s'apparente au remodelage hypertrophique dirigé vers l'extérieur, décrit précédemment^{353, 354}. Il est démontré qu'une augmentation significative du débit sanguin, sous-jacent à la création d'une fistule artério-veineuse impliquant

l'artère carotidienne gauche et la veine jugulaire, induit un remodelage de l'artère carotidienne. Il se définit par une augmentation du diamètre externe, une diminution de l'épaisseur de la paroi artériel et par une aire de section plus grande^{353, 354}. À l'intérieur d'une deuxième étude dans laquelle une fistula est établie entre l'aorte et la veine cave, une augmentation du diamètre externe artériel, associée à une plus grande lumière et à une diminution de l'épaisseur de la paroi vasculaire est observée. L'effet vasodilatateur est produit en réponse à l'augmentation du débit dans l'aorte. Il y a une élévation de la tension pariétale et, en accord avec la loi de Laplace, une augmentation de l'aire de section aortique s'établit. Toutefois, en raison de l'augmentation importante de la lumière aortique, l'augmentation du contenu pariétal est associée à une diminution de l'épaisseur de la paroi aortique. Ce type de remodelage artériel relié à l'augmentation du débit a donc été qualifié de remodelage expansif³⁵³. Au cours d'un entraînement aérobie, des changements hémodynamiques importants surviennent. Sachant que 84% du débit cardiaque est redistribué vers les régions musculaires actives³⁵⁵, on comprend que le débit artériel perfusant les muscles recrutés par l'exercice s'élève de manière substantielle, et les forces de cisaillements induites le long des cellules endothéliales augmentent, permettant une production accrue de NO. Très peu d'études se sont intéressées au remodelage vasculaire induit par l'entraînement aérobie³⁵⁶, toutefois il existe quelques évidences démontrant un élargissement des artères de conductance suite à un entraînement aérobie. De plus, la contribution du NO semble essentielle à la mise en place de ce mécanisme de remodelage³⁵⁷.

1.4.2 Le système rénine-angiotensine et le remodelage vasculaire hypertrophique

L'angiotensine II et le remodelage vasculaire des artères de résistance in vivo

L'Ang II contribue aux changements structuraux associés au développement de l'hypertension artérielle^{298, 358}. Il y a déjà plus de dix ans, l'Ang II a été proposé comme facteur impliqué dans la mise en place du remodelage vasculaire hypertrophique *in vivo*. Toutefois, l'action directe de l'Ang II dans le remodelage des artères de résistance a pu être contestée. Sachant que ce peptide induit une augmentation de la pression artérielle, il est possible de prétendre que l'effet hémodynamique induit par l'Ang II soit responsable des changements de la structure des artères de résistance. Afin de palier à ce problème et démontrer l'action directe de l'Ang II *in vivo*, une co-administration d'Ang II et d'hydralazine, un agent anti-hypertenseur non-associé au SRA et induisant aucun changement structurel, a été effectuée. L'hydralazine a prévenu l'augmentation de la pression artérielle sans modifier les changements de la structure des artères de résistance entraînés par l'Ang II. À l'instar des observations obtenues par Griffin et col., d'autres auteurs ont rapporté que les modifications de la structure artérielle produite par l'Ang II ne sont pas directement associées aux variations de la pression artérielle³⁵⁹. *In vivo*, l'administration d'une dose non-pressive d'Ang II, stimule des mécanismes associés à l'hypertrophie cellulaire, telle l'activité de la pompe Na^+/K^+ , appuyant encore une fois l'idée que l'Ang II entraîne un effet trophique direct sur la structure vasculaire³⁶⁰. Aujourd'hui, un nombre impressionnant d'études abondent en ce sens et appuient la contribution du SRA, au-delà de son effet hémodynamique, au développement du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance^{271, 282, 361, 362}.

Cette modulation de la structure des artères de résistance par l'Ang II consiste en un épaississement de la paroi vasculaire associée à une augmentation de l'aire de section. De plus, ce changement de structure peut être accompagné d'une diminution significative de la lumière vasculaire³⁶³, tout comme elle peut demeurer stable²⁷¹. Les

processus de croissance cellulaire, induits par l'Ang II à l'intérieur de la paroi des artères de résistance, ne sont pas uniformes d'une étude à l'autre. Bien qu'il soit proposé que cet épaississement correspond à une hypertrophie des types cellulaires (i.e. à une augmentation de la grosseur des cellules)^{364, 365}, certains travaux affirment qu'un phénomène hyperplasique est induit (i.e. à une augmentation du nombre de cellules)³⁶⁶. Les changements morphométriques induits par l'Ang II sont sous-jacents à des altérations au niveau des CMLVs ainsi qu'à des éléments de la matrice extra-cellulaire, et ces modifications s'intègrent afin de produire le remodelage vasculaire. Au cours de la présente discussion, les changements cellulaires pouvant s'installer au sein de la paroi artérielle seront abordés plus en détail. Bien qu'il existe des différences entre les observations effectuées *in vitro* et *in vivo*, il est possible que les deux composantes (hypertrophique et hyperplasique) de la croissance vasculaire de l'Ang II s'expriment tout au long du territoire formant les artères de résistance, mais de manière non-uniforme³⁶⁷.

L'angiotensine II et le remodelage vasculaire des artères de conductance in vivo

La contribution de l'Ang II au remodelage vasculaire a aussi été observée dans les artères de conductance. Un certain nombre de travaux ont démontré dans l'aorte, les carotides et les artères mésentériques de première ordre, une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire³⁶⁸⁻³⁷⁰. De même, des travaux effectués à l'intérieur de notre laboratoire ont suggéré, suite à une évaluation de la synthèse protéique aortique qui correspond à un indice d'hypertrophie vasculaire, un épaississement de la paroi des artères de conductance^{335, 365}. Illyes et al. ont rapporté une augmentation de l'épaisseur de la paroi des artères mésentériques de première ordre sans observer de modification du diamètre interne³⁶⁹. La quantification de l'aire de section vasculaire permet d'affirmer qu'il y a une synthèse accrue au sein de la paroi, toutefois les résultats démontrent que ce remodelage correspond bien à une hypertrophie et non à une hyperplasie des CMLVs. *In vivo*, le rôle direct d'une libération chronique d'Ang II sur la croissance des cellules formant la paroi des artères de conductances fait l'unanimité. Toutefois, comme il a été discuté pour les

artères de résistance, l'expression "remodelage hypertrophique" peut désigner autant un phénomène d'augmentation de la grosseur des cellules qu'un phénomène d'augmentation du nombre de cellules. Ainsi, les résultats rapportés à ce sujet sont partagés. Certaines études ont observé que l'Ang II induit un effet hyperplasique et hypertrophique³⁶⁸. De même, il est suggéré *in vivo* que l'Ang II active uniquement des mécanismes hypertrophiques au niveau de la paroi des artères de conductance^{366,369}.

L'angiotensine II et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires

La production vasculaire d'Ang II est localisée dans les cellules endothéliales, dans les CMLVs de la média ainsi que dans les cellules péri-vasculaires formant l'adventice⁹¹. L'action autocrine et paracrine de l'Ang II est déclenchée suite à son interaction avec son récepteur AT₁ localisé au niveau des CMLVs³²². Ces dernières constituent, selon certains auteurs, le facteur central du remodelage vasculaire³²². La croissance des CMLVs qui comprend les processus d'hyperplasie et d'hypertrophie compte parmi les effets associés au remodelage vasculaire induit par l'Ang II. L'hyperplasie est un mécanisme cellulaire difficilement réversible, impliquant une synthèse accrue d'ADN, donc une augmentation du nombre de CMLVs au sein de la paroi vasculaire³²². L'hypertrophie contrairement à l'hyperplasie est un phénomène réversible. Ce processus implique une augmentation de la synthèse protéique de même qu'il comprend l'activation et la synthèse de transporteurs transmembranaires, tels ceux de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, de l'échangeur Na⁺/H⁺, du transporteur Na⁺-dépendent du Mg²⁺, qui influencent le mouvement transmembranaire d'ions et d'eau³⁶⁷.

L'hyperplasie semble être importante dans le remodelage vasculaire. Néanmoins, les évidences expérimentales concernant les processus de croissance des CMLVs induits par l'Ang II, demeurent controversées. *In vitro*, dans des CMLVs aortiques de rats Wistar-Kyoto (WKY), une stimulation chronique à l'Ang II révèle une hétérogénéité de croissance entre les différentes lignées cellulaires³⁷¹. Parmi les 8 lignées cellulaires étudiées, seulement deux lignées de CMLVs aortiques démontrent que l'Ang II stimule

la synthèse d'ADN. Il est difficile d'expliquer la variabilité des mécanismes de croissance entre les lignées de CMLVs aortiques. Il est toutefois démontré que des différences génétiques existent parmi les rats WKY et pourraient expliquer l'action hétérogène de l'Ang II³⁷². Des souches de rats, autres que celle de rats WKY, ont aussi été utilisées afin d'étudier et d'établir les mécanismes de croissance sous-jacents à l'action de l'Ang II dans les CMLVs. Certaines études rapportent un effet hyperplasique ainsi qu'un effet hypertrophique^{373 374} et d'autres études observent uniquement une action hypertrophique de l'Ang II^{375,376}. Il est possible que des différences inter-espèces soient à l'origine de ces variabilités³⁷⁶. Les conditions expérimentales de même que les propriétés enzymatiques des extraits cellulaires utilisés pourraient aussi contribuer à ces divergences³⁷⁶. À la suite de ces résultats, une étude a exploré les mécanismes de croissance de CMLVs provenant de l'aorte et d'artères de résistance (< 300 μ m) d'origine humaine³⁷⁷. Il s'est avéré que l'Ang II stimule autant l'hyperplasie que l'hypertrophie dans les deux types de CMLVs. Toutefois, comme les auteurs précédents, il a été constaté que les conditions expérimentales *in vitro* sont déterminantes dans l'évaluation des mécanismes de croissance induits par l'Ang II et que la présence de facteurs de croissance dans le milieu de culture contribue à l'effet prolifératif (hyperplasie) de l'Ang II.

In vivo, Deamen et al. observent qu'une infusion chronique d'Ang II produit une augmentation significative de la synthèse d'ADN dans les CMLVs de l'aorte et des carotides³⁶⁸. Indépendamment des changements de pression, il est aussi observé que l'Ang II *in vivo* stimule la prolifération des CMLVs dans les artères mésentériques de rat³⁷⁸. Cette étude effectuée par le groupe Steven Schwartz a été réalisée à l'aide d'une dose très élevée d'Ang II et va à l'encontre des résultats rapportés précédemment^{341, 364}. Bien qu'il existe des évidences *in vivo*, suggérant un effet prolifératif de l'Ang II, il semble que cette hormone peptidique soit avant tout un agent hypertrophique. Les travaux démontrant *in vivo* une action proliférative de l'Ang II présentent souvent des conditions expérimentales distinctes des études suggérant un effet uniquement hypertrophique. Les doses d'Ang II peuvent être en effet très élevées³⁷⁸. Il est aussi proposé que la présence de facteurs de croissance, tel le PDGF_B et le "basic fibroblast

growth factor" (bFGF) pourraient contribuer à l'action proliférative de l'Ang II²⁶³. Le territoire vasculaire semble aussi important dans la détermination des mécanismes de croissance. *In vivo*, l'Ang II peut stimuler l'hyperplasie ainsi que l'hypertrophie des CMLVs des artères de conductance³⁷⁰ et démontre davantage un effet d'hypertrophie dans les artères de résistance³⁴¹. Finalement, une composante génétique pourrait expliquer certains résultats. Il est suggéré que l'effet hyperplasique des CMLVs de rats SHR serait génétiquement déterminé, indépendamment des phénomènes associés à l'hypertension³⁷⁹.

L'angiotensine II et l'induction de l'apoptose

L'apoptose est généralement définie comme un mécanisme de mort cellulaire programmé, associé à un programme génétique³⁸⁰. D'un point de vue morphologique et biochimique, l'apoptose se différencie de la nécrose. Elle est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une désagrégation membranaire, une fragmentation du noyau cellulaire et une condensation de la chromatine³⁸¹. L'apoptose est le plus souvent identifiée à son effet de fragmentation de l'ADN³⁸². Lors du développement de l'hypertension artérielle, des phénomènes apoptotiques seraient impliqués dans le remodelage vasculaire. Bien que ce mécanisme cellulaire semble important dans le remodelage eutrophique²⁶, il est possible qu'il prenne part au développement du remodelage hypertrophique.

L'Ang II est identifié comme un médiateur pouvant stimuler l'apoptose dans les CMLVs de l'aorte et dans différents types cellulaires^{383, 384}. L'action apoptotique de l'Ang II semble impliquer l'activation de son récepteur AT₂. Contrairement au récepteur AT₁ qui est généralement associé aux effets de croissance cellulaire de l'Ang II, l'activation du récepteur AT₂ contrebalancerait cet effet par son action antiproliférative³⁸⁵. Toutefois, cette conclusion semble s'appliquer davantage aux études *in vitro*, car *in vivo* les rôles des récepteurs AT₁ et AT₂ sont controversés dans le remodelage vasculaire^{386, 387}. La stimulation chronique à l'Ang II chez des rats normaux a permis d'observer que les deux récepteurs à l'Ang II, AT₁ et AT₂ sont associés à l'augmentation de l'apoptose des

CMLVs de l'aorte³⁸⁷. L'action de l'Ang II est évaluée sur une période de 7 jours de stimulation, à la suite de laquelle l'aire de section aortique n'a pas augmenté significativement. Il est possible que des mécanismes apoptotiques contribuent au remodelage vasculaire de l'Ang II au cours des premières journées de stimulation à l'Ang II. Toutefois, sur une plus longue période de temps, soit 14 jours, il est observé que l'aire de section aortique augmente de façon substantielle, laissant croire que les mécanismes de croissance deviennent plus importants³⁶⁹. Somme toute, plusieurs travaux constatent que le SRA et spécialement le récepteur AT₂, possède un rôle dans l'induction des mécanismes apoptotiques^{380, 384, 388, 389}.

L'angiotensine II et la prolifération de la matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire est aussi impliquée dans le remodelage vasculaire. Une synthèse accrue de tissu fibreux à l'intérieur de la média de la paroi vasculaire a été rapportée dans diverses conditions expérimentales associées à l'hypertension^{369, 390, 391}. Ce changement de la composition de la matrice extra-cellulaire qui comporte une synthèse accrue de collagène, de fibrilline, de fibronectine et de protéoglycanes contribue aux modifications fonctionnels de la paroi vasculaire dans l'hypertension³²⁵. Le collagène est assurément la protéine la plus importante de la matrice extra-cellulaire dans le remodelage vasculaire³⁹². Il est bien démontré dans des CMLVs d'origine animale que l'Ang II stimule la production de collagène^{393, 394}. Bien que ces expériences *in vitro* aient souvent été réalisées avec des doses non-physiologiques d'Ang II, elles supportent l'idée que l'Ang II permet une synthèse et une accumulation de collagène dans la paroi vasculaire. Afin d'appuyer ces études, il est rapporté que dans des CMLVs coronariennes humaines, l'administration d'Ang II, selon une concentration équivalente à celle retrouvée dans une condition vasculaire pathologique, stimule la production de collagène³⁹⁵. De plus, ce sont généralement les fibres de collagène de type I et III qui sont davantage synthétisées dans le remodelage vasculaire^{375, 396}.

In vivo, une reconfiguration de la matrice extra-cellulaire ainsi qu'une plus grande production d'éléments composants cette structure ont été observée suite à une

stimulation chronique à l'Ang II. Bien que ces effets puissent s'effectuer via les récepteurs AT_1 et AT_2 , les résultats concernant le rôle de ces récepteurs à l'Ang II dans la synthèse de la matrice extra-cellulaire demeurent controversés³⁹⁷. Illyes et al ont observé une élévation du contenu de la matrice extra-cellulaire de l'aorte suite à une stimulation de 12 semaines à l'Ang II³⁶⁹. De même, une stimulation d'une durée de 3 semaines à l'Ang II a permis d'augmenter le contenu total de collagène dans l'aorte via l'activation du récepteur AT_2 ³⁹⁸. Néanmoins, une étude précédente démontre que l'action profibrotique induit par l'Ang II s'effectue uniquement via le récepteur AT_1 ³⁹⁹. La composition de la matrice extra-cellulaire des artères de résistance est aussi influencée par l'Ang II. Dans une récente étude effectuée par le groupe de Schiffrin, il est démontré qu'une libération exogène d'Ang II pour une durée de deux semaines induit une synthèse de fibres de collagène de types I et III⁴⁰⁰. L'induction de la synthèse de la matrice extra-cellulaire par l'Ang II implique l'activation de différents facteurs autocrines. Il est proposé que le TGF_β et le PDGF tout comme l'IGF ("insulin growth factor") et le bFGF contribuent à l'action de l'Ang II^{392, 401}. Sans élaborer davantage sur les facteurs pouvant interagir avec l'Ang II, l'aldostérone et l'ET ont aussi été suggérés comme des intermédiaires à l'Ang II dans la production de la fibrose vasculaire^{347, 400}.

L'Ang II intervient aussi dans la synthèse de la matrice extra-cellulaire en diminuant l'activité des MMPs ("matrix metalloproteinase") qui représentent une famille de molécules associées à la dégradation des éléments de la matrice extra-cellulaire. Plusieurs MMPs sont présents dans la paroi vasculaire (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13)³⁹². Ils sont responsables de la dégradation des fibres de collagène, telles les fibres de type I, III, IV et V. Ils régularisent aussi la dégradation de la laminine, de la fibronectine et des protéoglycanes. Ainsi, dans l'hypertension, tout comme en présence d'une stimulation à l'Ang II, l'augmentation des composantes de la matrice extra-cellulaire implique une diminution significative de la concentration de MMPs⁴⁰². Une interaction entre des molécules d'adhésion et les MMPs serait aussi impliquée dans la modulation de la structure de la matrice extra-cellulaire³⁹⁰. Ainsi, les processus de remodelage vasculaire sont complexes et semblent impliquer l'interaction de nombreux facteurs. La matrice extra-cellulaire n'y échappe pas et l'Ang II l'influence en altérant

l'activité des MMPs ainsi qu'en augmentant l'activité des TIMPs ("tissue inhibitor of the MMP")⁴⁰³. Des observations similaires ont été rapportées chez des patients hypertendus. L'administration d'IECAs normalisent ou plutôt augmentent les niveaux plasmatiques de MMP-1 et MMP-9^{404, 405}. Ces résultats démontrent encore une fois le rôle des MMPs dans l'action pro-fibrotique de l'Ang II dans le développement de l'hypertension artérielle.

L'angiotensine II et l'inflammation

Le rôle de l'inflammation dans le remodelage vasculaire a été moins exploré. Des évidences suggèrent que l'Ang II par sa production d'ions superoxydes activerait des processus inflammatoires qui contribueraient aux mécanismes de remodelage des artères de conductance et de résistance³⁹². L'inflammation de la paroi vasculaire constitue un processus physiopathologique qui est généralement associé à un dommage vasculaire⁴⁰⁶. Cette condition est caractérisée par un recrutement de monocytes et de lymphocytes dans l'espace sous-endothélial. Une production accrue de cytokines et de molécules d'adhésion est rapportée et participerait aussi à l'évolution de l'état pathologique. Une prolifération de CMLVs et des changements au niveau de la matrice extra-cellulaire contribuent à la formation de la plaque athéromateuse et éventuellement à l'occlusion complète de l'artère de conductance qui est affectée. L'Ang II est en mesure d'activer des facteurs de transcription, tels NF- κ B (Natural factor kappa B) et AP-1 (Activator protein-1) qui sont essentiels à l'expression des molécules d'adhésion et à l'expression de plusieurs cytokines à l'intérieur de la paroi vasculaire^{407, 408}. Ainsi, plusieurs facteurs pro-inflammatoires, tels VCAM-1, ICAM, des E-sélectines et une panoplie de cytokines sont augmentées par l'action de l'Ang II^{407, 409, 410}. Ces facteurs sont souvent retrouvés en concentration plus importante dans le plasma des patients atteints d'hypertension artérielle, suggérant une inflammation vasculaire accrue et par le fait une augmentation du dommage de la structure artérielle et des autres organes cibles^{411, 412}. Bien que l'inflammation et la production d'ions superoxydes soient considérées comme des facteurs importants au développement de l'athérosclérose, leur implication au développement physiopathologique de l'hypertension artérielle n'est pas encore bien établie. Il est toutefois suggéré que les processus inflammatoires et la production de

stress oxydatif qui peuvent être associés à l'Ang II, influenceraient les éléments de la matrice extra-cellulaire et par le fait, altèreraient la structure vasculaire^{325, 413, 414}.

1.4.3 Le système nerveux sympathique et le remodelage vasculaire hypertrophique

L'influence du SNS dans le remodelage vasculaire hypertrophique a été étudiée de façon moins approfondie. De nombreuses études expérimentales et cliniques démontrent qu'au-delà des effets hémodynamiques, le blocage du SRA protège la structure artérielle³²⁵. Contrairement aux IECAs et aux antagonistes des récepteurs AT₁, il semble moins évident que les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques et α -adrénergiques interviennent sur la structure vasculaire en situation clinique bien qu'ils permettent de normaliser la pression artérielle⁴¹⁵. Toutefois, il existe des preuves expérimentales qui supportent l'idée que le SNS serait impliqué dans le remodelage vasculaire associé à l'hypertension artérielle²⁹⁴.

Le système nerveux sympathique et le remodelage des artères de résistance in vivo

Notre compréhension concernant le SNS et son rôle régulateur de la structure et de la fonction du système vasculaire s'est grandement développée au cours des années. Il y a déjà plus de vingt ans, le SNS avait été proposé comme médiateur important dans les changements structuraux associés au développement de l'hypertension artérielle⁴¹⁶. Une dénervation sympathique de l'artère centrale de l'oreille de lapin a permis de déterminer un rôle au SNS dans la croissance de la paroi vasculaire. Sans l'action du SNS, la croissance normale au sein de la paroi vasculaire n'est plus assurée⁴¹⁷. Néanmoins, certaines études utilisant d'autres conditions expérimentales n'ont pu démontrer les mêmes conclusions. Suite à une dénervation néonatale du SNS chez le rat, aucun changement concernant la structure des artères mésentériques n'est observé au cours du développement⁴¹⁸. De la même manière, une dénervation néonatale du SNS n'aggrave

pas davantage le remodelage des artères de résistance suite à une hypertension secondaire à une coarctation aortique⁴¹⁹.

L'exposition répétée au froid a aussi été utilisée comme modèle d'activation du SNS, et sans qu'un état hypertensif soit induit, un remodelage des artères mésentériques s'établit⁴²⁰. Ainsi, cette étude expérimentale soutient un rôle du SNS dans le développement du remodelage vasculaire hypertrophique. Bien que ces résultats proposent que le remodelage vasculaire hypertrophique des territoires extra-rénaux ne participe pas au maintien de l'hypertension artérielle³⁵⁹, il demeure que ces changements structuraux vasculaires induits par le SNS ne peuvent qu'être délétères à long terme et contribuent au dysfonctionnement cardiovasculaire²⁹⁴. Des travaux effectués au sein de notre laboratoire ont permis d'établir qu'une perfusion chronique de NE chez le rat induit aussi un remodelage hypertrophique des petites artères mésentériques²⁸². Les changements morphométriques démontrent une augmentation de l'épaisseur de la média sans que le diamètre de la lumière vasculaire ne soit modifié. De plus, grâce à une évaluation de l'aire de section, il a été possible d'identifier une hypertrophie cellulaire contribuant à un remodelage vasculaire hypertrophique.

Ainsi, il existe des évidences appuyant le rôle du SNS dans le remodelage hypertrophique des artères de résistance. De plus, des données expérimentales et cliniques suggèrent une participation de l'hyperactivité du SNS dans le phénomène de remodelage eutrophique^{421, 422}, vraisemblablement par la vasoconstriction produite. Le SNS est impliqué dans le développement physiopathologique des modèles de rat hypertendus SHR et 2K/1C où un remodelage eutrophique est observé⁴²³. Par ailleurs, l'hyperactivité du SNS est aussi impliquée dans le développement de modèle d'hypertension expérimental plus sévère, tel le modèle DOCA-sel, où un remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance est présent⁴²³. Chez l'humain, une hyperactivité du SNS est observée chez les patients atteints d'HE²⁹⁴ ainsi qu'à l'intérieur de plusieurs types d'hypertension secondaire⁴²⁴, telle l'hypertension rénovasculaire, l'hypertension associée un aldostéronisme et l'hypertension associée à un phéochromocytome⁴²². Ainsi l'hyperactivité du SNS qui est présente dans différents

types d'hypertension artérielle semble impliquée dans leur développement physiopathologique qui n'est pas uniforme^{337, 422}. D'autres systèmes neurohormonaux, modulateurs de la structure vasculaire pourraient interagir avec le SNS et produire des remodelages hétérogènes de la structure vasculaire. Ainsi, les interactions distinctes et complexes qui prennent place dans le développement physiopathologique de l'HE et de l'hypertension associée à un phéochromocytome, tout comme dans le développement physiopathologique de l'hypertension rénovasculaire et de l'hypertension associée à un aldostéronisme, permettent des adaptations variables de la structure des artères de résistance qui correspondent respectivement à un remodelage vasculaire eutrophique et hypertrophique.

Le système nerveux sympathique et le remodelage des artères de conductance in vivo

Dans des conditions *in vivo*, il est démontré que le SNS, suite à la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques, induit une prolifération des CMLVs de la paroi carotidienne⁴²⁵. Le rôle du SNS sur les changements de structure des artères de conductance a aussi été rapporté en créant une dénervation sympathique. Ainsi, suite à cette intervention, une croissance limitée de la paroi de l'artère saphène est induite, démontrant le rôle essentiel de ce système dans le développement du compartiment artériel⁴²⁶.

Récemment, des résultats obtenus par des membres de notre laboratoire ont permis d'accorder, une fois de plus, un rôle du SNS dans le remodelage hypertrophique des artères de conductance. Cette étude expérimentale a permis d'établir, *in vivo*, qu'une stimulation chronique à la NE induit un remodelage vasculaire hypertrophique de l'aorte³³². La paroi aortique devient plus épaisse, toutefois le diamètre de la lumière demeure identique. Le rapport média/lumière augmente significativement ainsi que l'aire de section qui constitue une preuve irréfutable d'une synthèse accrue du matériel cellulaire au sein de la paroi aortique. Les observations retenues par cette étude ont permis d'associer au remodelage hypertrophique de l'aorte, des modifications du

nombre de CMLVs aortiques. Une augmentation d'environ 50% du nombre de CMLVs aortiques est produite par la stimulation à l'aide de la NE pour une durée de 2 et 4 semaines. Ainsi, une hyperplasie des CMLVs, plutôt qu'une hypertrophie contribue au remodelage aortique rapporté. Une synthèse accrue des éléments de la matrice extra-cellulaire est aussi observée. Ceci implique une augmentation du nombre de fibres de collagène et des lamelles d'élastine. Le ratio collagène/élastine demeure semblable, toutefois l'élévation de ces deux composantes de la matrice extra-cellulaire contribue à l'augmentation de l'aire de section produit par la stimulation à la NE. Les observations de cette dernière étude n'ont pas établi le type de récepteurs adrénergiques impliqués dans ces changements de la structure des artères de conductance. Néanmoins, à la lumière d'observations obtenues *in vivo* et *in vitro*^{425, 427} il est vraisemblable de dire que les résultats rapportés impliquent une stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques (voir la prochaine section).

Les récepteurs adrénergiques pertinents au remodelage vasculaire

Il existe des données expérimentales *in vitro* et *in vivo* qui confèrent à l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques, un rôle dans la prolifération des CMLVs^{425, 428, 429}. Toutefois, l'activation des récepteurs du SNS dans ces changements de la structure vasculaire pourrait être plus complexe. *In vitro*, un rôle régulateur bien précis est accordé aux récepteurs α - et β -adrénergiques dans la prolifération des CMLVs ainsi que dans la production des éléments formant la matrice extra-cellulaire^{427, 430}. En accord avec plusieurs évidences déjà citées, suggérant qu'une prolifération des CMLVs aortiques est associée à la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques, il est aussi rapporté qu'une contribution des récepteurs β -adrénergiques contrebalancent cet effet en inhibant la prolifération des CMLVs aortiques⁴²⁷. De même, récemment, l'effet antagoniste pouvant s'établir entre l'activation des récepteurs α - et β -adrénergiques a été suggéré dans la régulation des éléments de la matrice extra-cellulaire⁴³⁰. L'étude de Nakaki et col., rapporte un effet inhibiteur de la croissance des CMLVs suite à une activation spécifique des récepteurs β_2 -adrénergiques⁴²⁷. De plus, les résultats obtenus par O'Callaghan et Williams démontrent qu'une activation sélective des récepteurs β_1 -adrénergiques inhibe

l'expression de l'ARNm du TGF_{β} , la production du collagène et la fibronectine, des facteurs qui contribuent à la formation de la matrice extra-cellulaire⁴³⁰.

À la lumière de ces résultats obtenus *in vitro*, il est possible de montrer une contribution précise du SNS dans le remodelage vasculaire hypertrophique. En dépit du rôle des récepteurs α_1 -adrénergiques dans la croissance au sein de la paroi vasculaire, contrairement au rôle inhibiteur attribué aux récepteurs β_1 -adrénergiques, il semble davantage favorable de bloquer l'action des récepteurs α_1 -adrénergiques. Ces observations *in vitro* concordent avec les résultats obtenus concernant l'efficacité des antagonistes β -adrénergiques. Au-delà de la normalisation de la pression artérielle, ces antagonistes ne démontrent aucun effet vasculo-protecteur^{9, 431}. Bien que leur blocage soit relié à la baisse de la pression artérielle, les résultats présentés par O'Callaghan et Williams suggèrent qu'un effet potentiellement délétère pour la structure vasculaire s'établit suite à l'inhibition sélective des récepteurs β -adrénergiques. Sachant que la prolifération de la matrice extra-cellulaire participe au remodelage vasculaire de plusieurs conditions *in vivo* associées au développement de l'hypertension^{26, 332}, le blocage des récepteurs β_1 -adrénergiques favoriserait la croissance des CMLVs, la production du TGF_{β} ainsi que la prolifération du collagène et de la fibronectine. Malheureusement, les données cliniques disponibles jusqu'à aujourd'hui ne permettent pas de supporter l'utilisation des antagonistes α_1 -adrénergiques comme intervention thérapeutique favorable en termes de protection cardiovasculaire. Selon les observations rapportées dans l'étude ALLHAT, l'incidence de développement d'événements cardiovasculaires est augmentée de manière significative en présence d'un traitement avec le doxazosin, un antagoniste α_1 -adrénergique^{161, 432} (voir section 1.3.4).

1.4.4 L'endothéline et le remodelage vasculaire hypertrophique

L'endothéline et le remodelage vasculaire des artères de résistance in vivo

Tel que décrit précédemment, l'hypertension artérielle induit des changements de la structure vasculaire qui peuvent prendre différentes formes. Ainsi, il existe une hétérogénéité dans le remodelage artériel, suggérant que l'élévation de la pression artérielle en soi ne constitue pas le seul élément responsable des changements de la structure artérielle. Depuis déjà plusieurs années, il est établi qu'au-delà de l'élévation de la pression artérielle, l'ET constitue un médiateur important dans la mise en place du remodelage hypertrophique de la paroi artérielle^{230, 433} (Tableau 1.2). En effet, le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance constitue une caractéristique majeure du modèle d'hypertension DOCA-sel où une surexpression de l'ET est localisée à la paroi vasculaire^{434, 435}. À l'instar de ce modèle expérimental, le modèle SHR où un traitement DOCA-sel est administré⁴³⁶, le modèle Dahl sensible au sel⁴³⁷ et le modèle SHR-SP³⁴⁴, un rôle essentiel de l'ET est accordé dans la mise en place du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance. En effet, à l'intérieur de toutes ces conditions d'hypertension expérimentale, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A prévient le développement de ce type de changement de la structure vasculaire sans absolument produire une réduction significative de la pression artérielle⁴³³. Ainsi, les antagonistes des récepteurs de l'ET sont plus efficaces afin de prévenir le remodelage vasculaire hypertrophique que pour réduire la pression artérielle. Ceci suggère que l'ET influence la structure vasculaire, indépendamment de la pression artérielle. Cette constatation est très importante, car elle implique l'idée que l'ET agit localement et qu'il contribue peu à la régulation systémique. Des travaux effectués à l'aide de souris transgéniques surexprimant l'ET supportent aussi ces conclusions. Lors du développement physiopathologique de ces souris, un remodelage structural est observé à de faibles concentrations d'ET, sans qu'une élévation de la pression artérielle soit rapportée^{438, 439}.

Dans le développement physiopathologique des modèles d'hypertension artérielle sensibles au sel, de même qu'en présence de certaines conditions d'hypertension rénovasculaire, un débalancement neuro-humoral est induit et un remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance est généralement associé. L'Ang II, la NE, la vasopressine et l'aldostérone sont des agents neurohormonaux qui peuvent être impliqués dans le développement physiopathologique de ces types d'hypertension artérielle^{276, 346, 423, 440}. Par conséquent, il est bien démontré qu'une augmentation significative de chacune de ces hormones induit l'expression de l'ET^{261, 282, 441, 442}. Ainsi, ce médiateur local représente un relais par lequel de nombreux systèmes semblent converger afin d'induire le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance. À l'exemple des observations rapportées dans les modèles d'hypertension artérielle sensibles au sel, une hypertrophie de la paroi des artères de résistance est produite par une administration chronique de NE sans qu'une élévation de la pression artérielle soit observée²⁸². L'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur ET_A, prévient ce remodelage vasculaire hypertrophique, suggérant encore une fois que cette altération vasculaire est indépendante de la pression artérielle, mais dépendante de la production locale de l'ET. Bien que l'action de l'Ang II implique une petite élévation de la pression artérielle, cette stimulation neurohumorale induit un remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance qui est prévenue par l'administration d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A indépendamment de l'effet sur la pression artérielle^{271, 282}. L'ET est donc un facteur très important au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance en contribuant essentiellement à l'effet hypertrophique activé par plusieurs voies neurohumorales.

Ainsi, à la lumière des résultats précédemment exposés, l'augmentation de facteurs neurohormonaux, tels l'Ang II, la NE, l'aldostérone et la vasopressine, mais surtout leur interaction avec l'ET, constituent des éléments majeurs à la mise en place du remodelage vasculaire hypertrophique.

L'endothéline et l'induction du remodelage vasculaire hypertrophique in vivo

Les preuves suggérant la contribution de l'ET au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance sont maintenant nombreuses²³⁶ (Tableau 1.2). Bien que l'ET semble davantage stimulé par des agents neuro-humoraux, il est impossible d'écarter l'influence de la variabilité de la pression artérielle et celle de la PP^{282, 443} à son induction et ainsi à l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Somme toute, indépendamment du stimulus ou des stimuli impliqués dans l'expression de l'ET, ce dernier représente l'élément initiateur de ce type de remodelage vasculaire des artères de résistance. L'ET est rapidement surexprimé suite à une administration chronique de NE²⁸². La concentration d'ET à l'intérieur de la paroi de ces artères augmente significativement au cours des 3 premiers jours de la stimulation. Toutefois, cette élévation de l'ET est passagère et diminue de manière significative lorsque la stimulation par la NE est poursuivie sur une période de 28 jours²⁸². Cette constatation expérimentale est essentielle car elle permet d'expliquer des échecs quant à la régression du remodelage vasculaire hypertrophique d'artères de résistance^{282, 444}.

Il est bien démontré que l'administration d'antagonistes du récepteur ET_A prévient la réponse hypertrophique de la paroi vasculaire (Tableau 1.2). Expérimentalement, ceci implique que l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A à l'ET est amorcée au même moment que la stimulation trophique, telle que peut se réaliser une libération constante d'Ang II ou de NE. Néanmoins, la régression du remodelage vasculaire hypertrophique représente une intervention bien différente et qui est parfois oubliée par différents investigateurs s'intéressant au remodelage vasculaire et au dommage des organes cibles dans le développement physiopathologique de l'hypertension¹⁹. La régression se définit par la capacité d'un traitement à renverser les altérations déjà établies. Ainsi, le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance, produit par une administration chronique d'Ang II ou de NE, ne peut être renversé par une administration d'un antagoniste ciblé au récepteur ET_A à l'ET²⁸². Ceci confirme le rôle transitoire de l'ET dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Son action est centrale à l'initiation de l'hypertrophie vasculaire, toutefois elle n'est pas nécessaire au processus

de maintien de ce type de remodelage vasculaire. Le rôle transitoire de l'ET semble pouvoir s'appliquer au modèle de rats 2K/1C et expliquerait l'absence d'effets des antagonistes du récepteur ET_A sur le remodelage cardiovasculaire lorsque les altérations sont déjà établies⁴⁴⁴.

Modèles d'hypertension	Surexpression de l'endothéline (vasculaire)	Antagoniste	Efficacité antihypertensive	Prévention du remodelage hypertrophique	Références
Doca-sel	↑	ET _{A/B}	↑ 22%	↑	Li et al. 1994
Doca-sel	↑	ET _A	↑ 67%	↑	Matsumura et al. 1999
NE	↑	ET _A	↑ 50%	↑	Dao et al. 2001
Ang II	↑	ET _A	↑ 55%	↑	Moreau et al. 1997
SHR-SP	↑	ET _A	↑ 10%	↑	Sharifi et al. 1998
Dahl-SS	↑	ET _A	↑ 50%	↑	Barton et al. 1998
Aldostérone	↑	ET _A	↑ 64%	↑	Park et al. 2001
1K/1C	↑	ET _{A/B}	↔	↔	Li et al. 1996
2K/1C	↔	ET _{A/B} , ET _A	↑ 40%	↑	Hoher et al. 1999 Biancotti et al. 2001
SHR	↔	ET _{A/B}	↔	↔	Li et al. 1995
L-NAME	↔	ET _{A/B}	↔	↔	Moreau et al. 1997
REN-2	↔	ET _{A/B}	↑	↔	Rossi et al. 2000 Gardiner et al. 2000
hREN-hAGT	↔	ET _A	↑ 22%	?	Muller et al. 2000

Tableau 1.2 Efficacité des antagonistes des récepteurs à l'endothéline:

Prévention de l'hypertension artérielle et du remodelage vasculaire hypertrophique

(Adapté de Dao H.H. et ,Moreau P. Expert Opin Investig Drug 10(11):1937, 2001)

↑ Efficace
↔ Non efficace

L'endothéline et le remodelage vasculaire des artères de conductance in vivo

Considérant le rôle des artères de résistance dans l'élévation de la résistance périphérique, un intérêt marqué a été porté au remodelage vasculaire hypertrophique de ces artères. Ainsi, le remodelage des artères de conductance et le rôle de l'ET dans la régulation de la structure de ces artères ont été, en quelque sorte, placés en second plan. Il n'en demeure pas moins qu'une hypertrophie de la paroi des artères de conductance implique une altération de leur compliance¹⁹. Des changements de la capacité élastique pourrait entraîner une augmentation de la PP et finalement induire un plus grand risque de développement d'un syndrome coronarien ou de diverses altérations des organes cibles⁴⁴⁵.

Le rôle de l'ET dans le remodelage vasculaire des artères de conductance a été observé dans le modèle d'hypertension DOCA-sel⁴⁴⁶. L'administration d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A augmente les mécanismes apoptotiques au niveau de l'aorte, suggérant que l'ET contribue à l'hypertrophie de la paroi aortique. De plus, il semble que l'ET agit aussi localement au niveau de la paroi des artères de conductance en contribuant à l'hypertrophie pariétale associée à une stimulation chronique par la NE et l'Ang II³³². Similairement à la NE qui induit dans la paroi des artères de résistance une augmentation du contenu en ET, il est aussi démontré qu'une stimulation chronique à l'Ang II augmente l'ET dans la paroi aortique²⁶². De plus, l'administration d'un antagoniste mixte pour les récepteurs ET_{A/B} prévient le remodelage vasculaire hypertrophique de l'artère carotidienne²⁷². Mais contrairement aux artères de résistance, l'intervention d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A peut régresser l'hypertrophie de la paroi de ces artères³³². Cette différence entre les deux territoires permet de suggérer des mécanismes cellulaires différents produisent l'hypertrophie de la paroi vasculaire. En effet, un phénomène d'hyperplasie cellulaire est associé à l'augmentation de l'aire de section de la paroi aortique, contrairement à un phénomène d'hypertrophie cellulaire au niveau des artères de résistance. La prolifération de la paroi aortique implique une augmentation du nombre de CMLVs³³². De même, le contenu de la matrice extra-cellulaire, relié au collagène et à l'élastine, devient plus important³³².

Ainsi, suite à l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur ET_A, il est proposé que l'ET constitue un intermédiaire essentiel au maintien de ces changements cellulaires induits par la stimulation chronique à la NE. Il existe des évidences *in vitro* qui supportent un rôle direct de l'ET dans la prolifération des CMLVs et dans la production de la matrice extra-cellulaire (Section 1.4.3). Ces aspects cellulaires qui montrent l'importance du rôle de l'ET dans le remodelage hypertrophique de la paroi des artères de conductance seront abordés plus tard. Toutefois, *in vivo*, il importe de constater que l'ET représente un intermédiaire essentiel quant à la régulation morphométrique des artères de conductance. Par ailleurs, en raison de l'hétérogénéité vasculaire, l'action trophique de l'ET n'est pas égale tout au long de l'arbre artériel. Des mécanismes cellulaires distincts sont induits et impliquent l'ET dans les artères de conductance et de résistance. Le rôle de l'ET peut être résumé de la manière suivante; il correspond au maintien du remodelage vasculaire hypertrophique au niveau des artères de conductance et à l'induction de l'hypertrophie de la paroi au niveau des artères de résistance¹⁹.

L'endothéline, la croissance et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires

Cellulairement, il est bien démontré que les éléments formant la paroi vasculaire, tels les CMLVs, sont impliqués dans le remodelage vasculaire hypertrophique²⁶. Les nombreux types cellulaires formant la paroi artérielle sont grandement influencés par l'action de l'ET dans des conditions pathologiques comme l'hypertension. Ainsi, des évidences ont été citées précédemment, autant au niveau des artères de résistance que des artères de conductance et permettent de relever le rôle essentiel que l'ET semble posséder dans le remodelage hypertrophique de la paroi vasculaire. *In vitro*, une régulation complexe de l'ET sur la croissance et la prolifération des CMLVs composant la paroi artérielle est aussi démontré²⁰².

Il est généralement rapporté dans les articles de synthèse traitant de l'ET que ce peptide stimule la croissance et la prolifération des CMLVs^{207, 229, 236}. Cette terminologie peut

porter à confusion et il s'avère important de spécifier que le terme « croissance » (growth en anglais) est associé à l'hypertrophie et le terme « prolifération » (proliferation en anglais) est associé à l'hyperplasie. L'administration d'ET stimule la synthèse protéique à l'intérieur des CMLVs en culture. Ainsi, ce peptide, par un mécanisme encore mal défini, induit l'hypertrophie des CMLVs²¹³ et cet effet peut être prévenu par l'administration du BQ-123, un antagoniste sélectif du récepteur ET_A. Il est aussi proposé qu'une inhibition des processus apoptotiques soit impliquée dans l'action cellulaire de l'ET⁴⁴⁶. Par ailleurs, l'ET exogène stimule, *in vitro*, la synthèse d'ADN des CMLVs^{202 207}. Partant du fait que l'ET détient un rôle direct dans la prolifération des CMLVs, il est observé qu'il augmente l'expression de proto-oncogènes impliqués dans la synthèse de l'ADN de ce type cellulaire²⁰². Ce rôle de l'ET, *in vitro*, concorde avec les observations, *in vivo*, discutées précédemment. Toutefois, cet effet prolifératif accordé à l'ET ne fait pas l'unanimité. À l'exemple de la complexité des interactions dans l'expérimentation *in vivo*, il est possible que des facteurs de croissance contribuent à l'action de l'ET. *In vitro*, certains auteurs rapportent que les conditions expérimentales, particulièrement le choix du sérum à l'intérieur duquel les CMLVs se retrouvent, contribuent à la variabilité des observations concernant la prolifération de ces cellules⁴⁴⁷. Ainsi, selon ces auteurs, cette action de l'ET ne semble pas directe. À l'appui de cette opinion, il est cité que l'ET possède une faible capacité à stimuler, par lui-même, la prolifération de CMLVs⁴⁴⁸. Toutefois, son action devient beaucoup plus importante en présence de facteurs de croissance, tels le bFGF, le PDGF et le TGF β , ce qui soutient l'idée que l'ET induit son effet hyperplasique de manière synergique avec ces facteurs²⁰². Néanmoins, les opinions demeurent partagées et nous empêchent d'accorder un rôle précis à l'ET dans les changements cellulaires associés au développement de l'hypertrophie de la paroi vasculaire chez l'humain. Une étude a cherché à éclaircir cette question à l'aide de CMLVs aortiques d'origine humaine⁴⁴⁷. Les résultats montrent que l'action proliférative de l'ET s'effectue préférentiellement via la stimulation du récepteur ET_A de l'ET. De même, cet effet nécessite la contribution du PDGF, supportant une fois de plus le rôle co-proliférateur de l'ET.

In vivo, d'un point de vue cellulaire, l'action trophique directe de l'ET demeure mal comprise. Très peu d'évidences permettent d'établir si l'ET induit, en soi, un effet hypertrophique et/ou un effet hyperplasique dans les artères de résistance. Récemment, des résultats ont été obtenus par notre laboratoire, suggérant que l'action hyperplasique et hypertrophique de l'ET est dépendante de sa concentration retrouvée à l'intérieur de la paroi artérielle des artères de résistance³³³. Une administration chronique d'ET à une concentration élevée ($>5\text{pmol/kg/min}$) entraîne un remodelage vasculaire correspondant à un phénomène hyperplasique. De plus, lorsque les concentrations d'ET administrées sont moins importantes ($<1\text{pmol/kg/min}$), le remodelage vasculaire qui y est associé consiste en une hypertrophie des éléments cellulaires formant la paroi. Sachant qu'en fonction de la sévérité de l'état pathologique, les concentrations d'ET tissulaires varient³¹⁶, les résultats obtenus par notre laboratoire précisent le rôle de l'ET quant aux mécanismes cellulaires qu'il active dans le remodelage de la paroi vasculaire des artères de résistance.

L'endothéline et la prolifération de la matrice extra-cellulaire

Il n'a pas été établi jusqu'à aujourd'hui, qu'une stimulation neurohumorale entraîne une prolifération de la matrice extra-cellulaire dans le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance²⁸². Au contraire, une induction des éléments de la matrice extra-cellulaire est rapportée suite à une stimulation neuro-humorale chronique dans les artères de conductance³³². Dans ce contexte, il est suggéré *in vivo* que l'ET constitue un intermédiaire dans cette production accrue d'éléments de la matrice extra-cellulaire qui correspondent au collagène et à l'élastine. Toutefois, l'hyperplasie de la paroi aortique implique un maintien du rapport collagène/élastine, suggérant que la paroi aortique devient davantage élastique que rigide, compte tenu de l'hyperplasie des CMLVs. De plus, l'administration d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A permet de renverser la production accrue de collagène (75%) et de manière moins importante la production accrue d'élastine (50%)³³².

La synthèse et la sécrétion accrue d'éléments de la matrice extra-cellulaire ont été associées à l'action de l'ET dans le développement physiopathologique de l'hypertension artérielle, mais aussi dans le développement de pathologies, telles l'hypertension pulmonaire où des changements délétères de la structure des artères pulmonaires impliquent l'ET²⁰⁵. Ces éléments de la matrice extra-cellulaire peuvent comprendre le collagène des types I et III, l'élastine, des glycoprotéines, la thrombospondine, la fibronectine et la ténascine^{449, 450}. Ainsi, l'administration d'antagonistes du récepteur ET_A à l'ET pourrait prévenir une élévation de la rigidité des artères de conductance. Bien que ceci demeure spéculatif, il est plausible que l'antagoniste du récepteur ET_A améliore la rigidité des artères de conductance et altère l'élévation de la pression systolique en présence d'HSI¹⁹.

1.4.5 Le remodelage vasculaire hypertrophique et les interactions entre le système rénine-angiotensine, le système sympathique et l'endothéline

L'interaction entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique

Suite à la stimulation de son récepteur AT_1 localisé à la jonction pré-synaptique, l'Ang II augmente l'activité sympathique¹⁴⁵. De plus, il est possible que l'Ang II augmente l'activité vasoconstrictrice de la NE en intervenant à la jonction post-synaptique⁴⁵¹. À l'inverse, l'hyperactivité du SNS influence la sécrétion de rénine de l'appareil juxta-glomérulaire en stimulant le récepteur β_1 -adrénergique, localisé dans cette structure, et ainsi induit une plus grande synthèse d'Ang II²⁴⁷. Ces mécanismes peuvent contribuer au maintien de l'hypertension artérielle (Section 1.3.4). Toutefois, l'impact de ces interactions réciproques semble s'établir au-delà de la régulation de la pression artérielle. *In vivo*, en présence de conditions expérimentales variables, il est proposé que l'action du SNS soit essentielle à l'hypertrophie de la paroi vasculaire produite par une stimulation à l'Ang II.

Par l'intermédiaire d'un agent pharmacologique, le 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une sympathectomie est induite⁴⁵². À l'aide d'une mini-pompe implantée sous la peau de la région thoracique du rat, une libération continue d'Ang II est appliquée. En combinaison à cette stimulation, l'administration de 6-OHDA qui altère le SNS, inhibe l'effet prolifératif des CMLVs activés par l'Ang II. Les résultats de ce travail coïncident avec ceux de deux études ultérieures, où l'antagoniste du récepteur α_1 -adrénergique prévient la prolifération des CMLVs stimulée par l'Ang II à l'intérieur de la paroi d'artères de conductance^{453, 454}. L'action préventive du 6-OHDA à la prolifération des CMLVs n'est pas associée à un changement de la lumière et de l'aire de section artérielle. Ainsi, il est proposé que le SNS ne contribue pas au remodelage vasculaire hypertrophique induit par l'Ang II dans les artères de conductance⁴⁵². En accord avec cette conclusion, il est observé à l'aide du doxazosin, un inhibiteur spécifique pour le récepteur α_1 -

adrénergique, une diminution significative de la synthèse d'ADN produite par une stimulation chronique à l'Ang II⁴⁵⁴. Toutefois, l'aire de section n'est pas normalisée. La contribution du SNS à l'action de l'Ang II semble être ciblé aux CMLVs. L'intervention d'un antagoniste spécifique pour le récepteur AT₁ à l'Ang II prévient le remodelage hypertrophique produit par la stimulation chronique à l'Ang II⁴⁵⁵. L'action hypertrophique vasculaire de l'Ang II comprend une élévation du nombre de CMLVs, mais aussi une plus grande production du collagène et de l'élastine, des éléments de la matrice extra-cellulaire³⁹³. Ainsi, l'incapacité à prévenir l'hypertrophie de la paroi vasculaire en présence d'une sympathectomie suggère une implication cellulaire spécifique du SNS au changement de la structure des artères de conductance. L'activation du récepteur α_1 -adrénergique participe à la prolifération des CMLVs, toutefois elle n'entraîne pas une plus grande production des éléments de la matrice extra-cellulaire qui est importante dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Une critique peut être apportée à cette conclusion. Présentement, il est bien connu que la NE stimule la production de la matrice extra-cellulaire dans des conditions *in vitro*⁴³⁰ (Section 1.4.4). Sachant que la sécrétion de catécholamines des médullo-surrénales n'est pas prévenue par le traitement au 6-OHDA, un blocage incomplet du SNS est présent. Ainsi, il demeure plausible que cette intervention ne soit pas assez agressive et qu'elle empêche d'évaluer complètement le rôle du SNS dans le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de conductance. Par ailleurs, en présence d'une procédure de sympathectomie plus agressive, où une destruction pharmacologique de l'activité du SNS est effectuée en compagnie d'une ablation surrénalienne, on observe une prévention de l'hypertrophie de la paroi vasculaire des artères de conductance par une stimulation chronique à l'Ang II⁴¹⁸. Contrairement aux observations rapportées précédemment à l'aide d'un traitement avec le 6-ODHA, des changements morphométriques sont observés dans ce deuxième modèle expérimental. Un remodelage hypotrophique des artères de conductance, dirigé vers l'extérieur, est identifié suite à la sympathectomie. Sachant que l'Ang II entraîne une hypertrophie de la paroi vasculaire, la lyse complète du SNS prévient ce remodelage vasculaire. Cette lyse plus agressive du SNS normalise la pression artérielle et suggère qu'une hypertension artérielle sévère et/ou une hyperactivité importante du SNS est nécessaire à la mise en place du remodelage

hypertrophique stimulé par l'Ang II. De plus, la sympathectomie n'influence pas le remodelage hypertrophique induit au niveau des artères de résistance. Afin d'expliquer cette observation, il est suggéré que l'Ang II induit sélectivement une vasoconstriction des artères de résistance mésentériques, contrairement à la NE qui entraîne une vasoconstriction égale tout au long de l'arbre artériel du territoire mésentérique⁴⁵⁶. Il est possible qu'une plus grande densité de récepteurs AT₁, ou une sensibilité accrue pour l'Ang II explique l'absence de participation du SNS à son effet vasoconstricteur. Il est plausible de spéculer que ces observations sont transférables à l'interaction entre l'Ang II et le SNS dans le remodelage hypertrophique des artères de conductance et de résistance du territoire mésentérique.

L'interaction entre le système rénine-angiotensine et l'endothéline

In vitro, il a été rapporté que l'Ang II induit l'expression de l'ARNm de la prepro-ET⁴⁵⁷. De même, la production d'ET, a été évaluée dans des artères mésentériques isolées et, en accord avec les résultats obtenus *in vitro*, la production vasculaire d'ET devient plus importante suite à une stimulation aigue à l'Ang II²⁷⁹. Finalement, ce mécanisme a pu être établi en conditions *in vivo*²⁷¹. L'induction par l'Ang II de la concentration locale d'ET est retrouvée au niveau des cellules endothéliales, mais aussi dans d'autres types cellulaires. Les CMLVs, les fibroblastes et les cardiomyocytes sont des types cellulaires associés à cet effet, suggérant que l'interaction Ang-ET prend place à différents niveaux à l'intérieur de la paroi vasculaire mais aussi au niveau du myocarde⁴⁵⁸. À la lumière de ces observations *in vitro* et *in vivo*, une réflexion concernant l'importance associée à l'induction de l'ET par l'Ang II, tout spécialement au niveau de la structure vasculaire, a stimulé l'intérêt de plusieurs scientifiques. Cette production accrue d'ET ne semble pas être sans importance d'un point de vue physiologique et physiopathologique. Le rôle intermédiaire de l'ET avec l'Ang II a déjà été discuté dans la régulation hémodynamique (Section 1.3.8). À la suite de ces observations, des évidences expérimentales suggèrent aussi un rôle d'intermédiaire de l'ET dans le remodelage vasculaire hypertrophique induit par l'Ang II.

L'Ang II tout comme l'ET possède un rôle bien établi dans le remodelage de la structure vasculaire¹⁹. Leurs effets sur la structure artérielle sont identifiés comme bénéfiques lors de la phase initiale du remodelage, toutefois elles deviennent rapidement délétères pour l'intégrité du système artériel (Section 1.4.2 et Section 1.4.4). Contrairement aux observations rapportées concernant la vasoréactivité, les évidences reliées au remodelage vasculaire hypertrophique suggèrent une plus grande complexité mécanistique. La compréhension de ce type de remodelage vasculaire amène beaucoup d'interrogations, spécialement le rôle de l'interaction Ang II - ET et son blocage afin de prévenir et/ou régresser le remodelage vasculaire hypertrophique.

L'Ang II a bien été décrit comme un facteur trophique hautement responsable du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance^{271, 341, 459}. Sachant que la production d'ET est induite dans la paroi des artères de résistance, le rôle potentiel de cette interaction Ang-ET au remodelage vasculaire constitue un mécanisme intéressant à étudier. Ainsi, *in vivo*, suite à une stimulation chronique à l'Ang II, le contenu en ET à l'intérieur de la paroi des artères de résistance augmente significativement²⁷¹. De plus, l'administration d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A, initiée au même moment que la stimulation, a permis d'observer une prévention du remodelage vasculaire hypertrophique²⁷¹. Ce résultat concorde d'ailleurs avec une baisse significative du contenu vasculaire en ET, confirmant l'hypothèse que l'ET est un intermédiaire essentiel dans le remodelage vasculaire hypertrophique produit par l'Ang II *in vivo*. À l'aide d'un modèle d'hypertension rénovasculaire, il est observé qu'un remodelage vasculaire hypertrophique des petites artères coronaires intra-myocardiques est prévenu à l'aide d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A²⁷⁶. Ainsi, cette étude abonde dans le même sens et suggère un effet hypertrophique de l'ET qui s'expliquerait via l'induction de la production locale d'ET par l'Ang II. Cette explication est considérée la plus plausible. Le rôle de l'ET dans la prévention et la régression du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance a été discuté au cours d'une section précédente (Section 1.4.4). À la lumière de ces résultats, il semble bien établi que l'ET constitue un intermédiaire essentiel à l'initiation du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance suite à une stimulation à l'Ang II²⁸².

De plus, lorsque l'hypertrophie de la paroi vasculaire est mise en place, le blocage du récepteur ET_A ne peut renverser les changements de la structure vasculaire, suggérant que l'ET ne soit pas impliqué dans le maintien du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance stimulées par l'Ang II.

À l'aide de ces observations rapportées dans le territoire composant les artères de résistance, le territoire artériel comprenant les artères de conductance est aussi affecté par cette interaction impliquant l'Ang II et l'ET dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Dans un modèle de stimulation chronique à l'Ang II, il est bien démontré qu'un antagoniste mixte pour les récepteurs $ET_{A/B}$ prévient le remodelage vasculaire hypertrophique de la carotide²⁷². De plus, suite à la stimulation chronique à l'Ang II, le contenu en ET à l'intérieur de la paroi des artères de conductance est induit significativement²⁶². Ainsi, ces observations confirment le rôle indispensable de l'ET dans l'action hypertrophique de l'Ang II dans les artères de conductance. Par ailleurs, cette action de l'Ang II a fait l'objet de recherche dans un protocole de régression²⁷⁵. Contrairement au blocage mixte des récepteurs $ET_{A/B}$, initié au même moment que la stimulation à l'Ang II, l'administration d'un antagoniste mixte pour ces deux récepteurs de l'ET, au dixième jour d'un intervalle de stimulation d'une durée de 17 jours, n'entraîne aucune régression du remodelage vasculaire hypertrophique de la carotide. Toutefois, il est démontré que l'administration d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A , régresse l'hypertrophie de la paroi aortique déjà établie³³². Il semble donc possible que l'action des antagonistes mixtes soit moins efficace que celle de l'antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A afin de renverser le remodelage vasculaire des artères de conductance.

La contribution de la pression artérielle constitue un facteur généralement discuté dans le remodelage vasculaire et l'intervention des antagonistes des récepteurs de l'ET. La stimulation chronique à l'Ang II pour une durée de 3 semaines induit une élévation de certains paramètres hémodynamiques, voulant que l'action trophique de l'ET *in vivo* ne corresponde pas uniquement à un effet direct, mais aussi à un effet indirect associé aux changements hémodynamiques²⁸². Bien qu'une contribution de ces derniers facteurs ne

doive pas être négligée, il est observé que l'intervention de l'antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A prévient dans les artères de résistance et régresse dans les artères de conductance le remodelage vasculaire principalement par un mécanisme indépendant de la pression artérielle^{282,332}. En opposition, suite à une stimulation chronique à l'Ang II, la prévention de l'hypertrophie de la paroi de la carotide, induite par l'action des antagonistes mixtes, est reliée à une prévention significative de l'hypertension²⁷². De plus, l'incapacité de cet antagoniste à renverser l'hypertrophie de la paroi de la carotide coïncide avec un maintien de l'hypertension²⁷⁵. Ainsi, bien que la pression artérielle puisse contribuer au remodelage vasculaire des artères de conductance, les résultats obtenus avec un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A montrent que la participation de l'ET au changement de la structure des petites artères s'établit indépendamment de l'élévation de la pression artérielle³³². De plus, sachant que les résultats impliquant l'administration d'un antagoniste mixte $ET_{A/B}$ observés à l'aide de protocoles de prévention et de régression sont directement associés à la modulation de la pression artérielle, nous pouvons spéculer que l'action de ce deuxième type d'antagoniste à l'ET soit largement associé aux facteurs hémodynamiques.

L'interaction entre le système nerveux sympathique et l'endothéline

Le rôle de l'ET comme médiateur local à l'action d'une stimulation du SNS a été beaucoup moins exploré. Toutefois, il existe quelques évidences expérimentales qui supportent l'idée que l'ET constitue un intermédiaire essentiel à l'action du SNS dans l'hypertrophie cardiovasculaire. Dans des cellules endothéliales en culture, une stimulation par la NE induit la libération d'ET^{201, 207}. De plus, dans des conditions *in vivo*, il est bien démontré qu'une stimulation chronique par la NE augmente l'expression de l'ARNm de la prepro-ET²⁸¹. Ainsi, l'administration d'un antagoniste mixte pour les récepteurs $ET_{A/B}$ à l'ET permet de prévenir l'hypertrophie cardiaque, suggérant que l'induction de l'ET par la NE contribue à son effet⁴⁶⁰.

Des travaux effectués par notre équipe de recherche, au sein du compartiment vasculaire, ont aussi permis d'établir que l'hypertrophie de la paroi des artères de résistance

implique la contribution locale de l'ET²⁸². Comme il a été abordé plus tôt au cours de cette thèse, (Section 1.4.3) la stimulation chronique par la NE induit un remodelage hypertrophique de la paroi des artères de résistance. De plus, cet effet est produit via l'ET. Sans discuter à nouveau de ces observations, il importe de souligner, à l'aide des résultats obtenus avec l'Ang II, que la NE nécessite, de la même manière, l'ET lors du développement de l'hypertrophie de la paroi des artères de résistance. Similairement, lorsque le processus de remodelage vasculaire est mis en place, l'administration d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A ne peut renverser l'hypertrophie de la structure vasculaire. L'élévation du contenu en ET constatée dans la paroi des artères de résistance est immédiate et transitoire à la suite d'une stimulation chronique par la NE (Section 1.4.4). L'intervention sympathique dans le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance nécessite donc la contribution locale de l'ET afin d'induire son effet et non pour le maintenir.

Une interaction s'établit entre la NE et l'ET lors du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de conductance³³². À la suite des résultats obtenus avec l'Ang II à l'aide d'un protocole expérimental de prévention, l'administration d'un antagoniste spécifique au récepteur ET_A permet de renverser le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de conductance induit par une stimulation par la NE. Ainsi, contrairement au rôle de l'ET lors du développement du remodelage vasculaire des artères de résistance, l'ET semble participer, dans les artères de conductances, au maintien du remodelage vasculaire hypertrophique induit par une stimulation sympathique³³². Bien que le contenu tissulaire en ET, suite à une stimulation chronique neurohumorale, s'établissant sur une période de plusieurs semaines, n'a jamais été évalué dans la paroi d'artères de conductance, l'identification de mécanismes cellulaires spécifiques constituent jusqu'à présent l'explication la plus plausible quant aux résultats différents entre ces deux types d'artères (Section 1.4.3). Ainsi, le rôle distinct, mais essentiel de l'ET au remodelage vasculaire des artères de conductance induit par la NE s'explique par un effet hyperplasique des CMLVs et de la matrice extra-cellulaire, contrairement à un effet cellulaire hypertrophique dans les artères de résistance.

1.5 LA SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉE DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE HYPERTROPHIQUE

Les sentiers de signalisation cellulaire impliqués dans le dommage associé à l'hypertension artérielle constituent un sujet hautement étudié. De nombreux travaux ont permis de mieux comprendre les événements cellulaires associés à l'hypertension artérielle à l'aide de CMLVs en culture. Le développement physiopathologique de l'hypertension artérielle produit des altérations de la signalisation cellulaire qui expliquent le plus grand effet vasoconstricteur (ou la diminution de la vasodilatation), l'apparition de phénomènes inflammatoires ainsi que le remodelage vasculaire associé à une hypertrophie et une hyperplasie cellulaire⁴⁶¹. En raison de l'interaction s'établissant entre l'Ang II et l'ET lors du développement physiopathologique de l'hypertension artérielle, l'objectif de la prochaine section est de décrire les sentiers de signalisation associés à l'Ang II et à l'ET dans le remodelage vasculaire hypertrophique. Certains événements cellulaires activés par ces peptides peuvent être rapidement induits. De plus, ils peuvent contribuer à des sentiers de signalisation plus tardifs et plus soutenus et ainsi être responsables de la modification de la structure vasculaire. Bien que leur compréhension dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire demeure incomplète, des sentiers de signalisation distincts sont mis en place et pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention et le développement physiopathologique des complications de l'hypertension artérielle.

1.5.1 La signalisation cellulaire de l'angiotensine II

L'activation du récepteur AT₁

La stimulation de ce récepteur par l'Ang II permet l'activation de divers sentiers de signalisation. Ils induisent des effets vasculaires à court terme, telle la contraction, et des effets vasculaires à long terme, telle l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire ainsi que la prolifération de la matrice extra-cellulaire⁹¹. Rapidement, suite à son activation, le récepteur AT₁ via les sous-unités de la protéine Gq est relié à cinq systèmes effecteurs dont les phospholipases C, D et A₂, l'adénylate cyclase et les canaux calciques. Ainsi, dans un court intervalle de temps, une contraction des CMLVs résulte de l'induction de ces voies. De plus, très rapidement, une activation de tyrosines kinases de la famille Src est mis en place et contribue à l'effet vasoconstricteur de l'Ang II, mais aussi au remodelage vasculaire qui s'établit sur un intervalle de plusieurs heures à plusieurs jours⁹¹. La signalisation cellulaire de l'Ang II abordée au cours de cette thèse sera ciblée uniquement sur l'activation du récepteur AT₁. L'activation du récepteur AT₂ ne sera pas discutée.

L'activation de la phospholipase C, de la protéine kinase C et de la voie ERK 1/2

L'activation du récepteur AT₁ permet une cascade d'événements cellulaires qui peut impliquer l'interaction de la protéine G_q avec la phospholipase C (PLC). Suite à son activation, la PLC hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) et permet la formation de deux seconds messagers, soit l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Figure 1.10). Il en résulte une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire par une mobilisation du Ca²⁺ présent dans le réticulum sarcoplasmique et par une entrée accrue de Ca²⁺ en provenance de l'espace extra-cellulaire⁹¹. Il existe différents isoformes de la PLC. L'activité de l'isoforme β est modulé par l'état des protéines G couplés aux récepteurs AT₁ (Figure 1.10). Ainsi, lors de la stimulation du récepteur AT₁, l'activité de la PLC _{β} est induit et permet la formation de l'IP₃⁴⁶². Ce second messenger

atteint le réticulum sarcoplasmique où il stimule la relâche de Ca^{2+} dans le cytosol. L'élévation du Ca^{2+} intra-cellulaire est très importante pour l'induction de la contraction des CMLVs.

Néanmoins, la contribution du Ca^{2+} s'exprime au-delà de cette réponse rapide et semble aussi impliquer le recrutement de tyrosines kinases non-réceptorielles afin d'induire l'hypertrophie de la paroi vasculaire⁴⁶³. Ainsi, il existe l'isoforme γ de la PLC qui active le DAG par l'intermédiaire de tyrosines kinases stimulées directement par le récepteur AT_1 .⁴⁶⁴ L'activation de la PKC constitue un événement cellulaire induit précocément et qui participe à l'initiation de la contraction des CMLVs⁹¹. Toutefois, à plus long terme, il est suggéré que la PKC constitue un événement cellulaire impliqué dans l'hypertrophie des CMLVs induite par une stimulation à l'Ang II⁴⁶⁴. Cette action de la PKC se poursuit via l'activation de protéines de la famille des MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases). Les MAPKs, une famille de sérine/thréonine kinases, constituent les kinases les plus importantes dans les réponses cellulaires. Cette famille regroupe trois classes, dont celle des ERKs (extracellular signal-regulated kinases). Ainsi, la PKC stimule deux kinases de la voie ERK, soit ERK1 et ERK2 qui représentent deux événements cellulaires importants dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par une stimulation à l'Ang II *in vitro*⁴⁶⁵ (Figure 1.10). Néanmoins, la contribution de la PKC à l'effet de l'Ang II n'est pas unanime. La croissance des CMLVs associée à une stimulation de l'Ang II peut s'effectuer via un mécanisme dépendant ou indépendant de la PKC³⁷⁴. Cette différence semble être spécifique à l'origine des CMLVs. De plus, la région vasculaire représente un aspect important. Le rôle de la PKC est observé dans les CMLVs aortiques⁴⁶⁶ mais pas dans les CMLVs provenant d'artères de résistance³⁷⁴. Dans la paroi vasculaire, la participation de la PKC n'est donc pas essentielle, mais peut contribuer dans certaines conditions, via l'activation de la voie ERK1/2, à l'augmentation de la synthèse protéique stimulée par l'Ang II⁴⁶⁷. Par ailleurs, l'induction du sentier de signalisation ERK1/2 dans l'action hypertrophique de l'Ang II peut impliquer d'autres événements de la signalisation cellulaire, telle l'activité des tyrosines kinases non-réceptorielles Src, la transactivation de récepteurs tyrosine kinase et la production de dérivés oxygénés réactifs⁴⁶¹.

Les tyrosines kinases non-réceptorielles, des événements de signalisation situés en amont dans la cascade de signalisations cellulaires de l'angiotensine II

L'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II entraîne une phosphorylation de protéines tyrosines kinases intra-cellulaires⁴⁶¹. Il existe 3 grandes classes de tyrosines kinases non-réceptorielles impliquées dans la signalisation de l'Ang II. Ce sont les tyrosines kinases de la famille Src (Homologue cellulaire de v-Src qui signifie Rous sarcoma virus), les tyrosines kinases FAK (focal adhesion kinase) et les tyrosines kinases Janus⁴⁶⁸. Bien qu'elles participent toutes aux effets de l'Ang II, la contribution des tyrosines kinases Src est particulièrement importante aux sentiers de signalisations associés au phénomène d'hypertrophie de la paroi vasculaire⁴⁶¹ (Figure 1.10). Les tyrosines kinases Src comprennent quatorze types qui peuvent être regroupés en 3 classes⁹¹. Il y a les types Src, Fyn, et Yes qui sont exprimés dans de nombreux types cellulaires. Les types Blk, Fgr, Hck, Lck et Lyn sont généralement retrouvés dans les cellules hématopoïétiques. Finalement, il y a les types reliés à la kinase Frk qui se situent dans les cellules épithéliales. Ainsi, le type Src et spécialement le sous-type c-Src (60 kD) ont été largement caractérisés. Ce dernier est hautement exprimé dans la paroi vasculaire et il est rapidement activé par l'Ang II dans une préparation de CMLVs^{469,470}. À l'intérieur de la structure du récepteur AT₁, un domaine d'interaction SH2 (Src-homology 2) est présent et constitue un site d'échafaudage afin de recruter les tyrosines kinases Src lorsqu'il est activé⁴⁶¹. L'activation des tyrosines kinases Src permet alors l'induction de plusieurs sentiers de signalisations cellulaires.

Les tyrosines kinases Src semblent être au coeur de l'activation de plusieurs voies de signalisations cellulaires associées à l'Ang II (Figure 1.10). Les tyrosines kinases Src sont essentielles à la phosphorylation de la phospholipase C γ qui permet de former le DAG et aussi l'IP₃^{91, 464}. Ainsi, cette activation des tyrosines kinases Src contribue à la mobilisation du Ca²⁺ intra-cellulaire et à l'activation de la PKC. En effet, une inhibition de la tyrosine kinase c-Src dans une préparation de CMLVs produit une diminution d'IP₃ et de PLC γ .⁴⁶⁸ Par ailleurs, l'activité de c-Src est essentielle à l'activation de la voie ERK 1/2 par l'Ang II⁴⁷⁰. Les tyrosines kinases Src, par l'intermédiaire de la molécule

adaptatrice Grb2, active la petite protéine G p21ras qui constitue un relais entre le signal induit par l'Ang II et l'activation de la voie des MAPKs, dont ERK1/2⁹¹. Le rôle indispensable des tyrosines kinases Src a aussi été démontré en présence de CMLVs provenant d'artères de résistance de patients atteints d'hypertension⁴⁷¹. Lors d'une stimulation à l'Ang II, la phosphorylation de c-Src active le sentier de signalisation ERK 1/2. Le blocage de l'activité des tyrosines kinases Src atténue significativement la phosphorylation de la voie ERK 1/2. De plus, l'inhibition de ERK1/2 (inhibition de MEK ou kinase de ERK) supprime la synthèse protéique et la synthèse d'ADN induite par l'Ang II dans les CMLVs de patients atteints d'hypertension artérielle. À la suite de l'activation du sentier de signalisation ERK1/2, via la tyrosine kinase c-Src, une augmentation de l'expression des facteurs de transcription c-myc, c-jun, c-fos et du complexe AP-1 (activator protein) qui contribuent à l'hyperplasie des CMLVs est induite. Ainsi, c-Src semble être un événement essentiel au sentier de signalisation cellulaire ERK1/2 associé à l'action hypertrophique et hyperplasique de l'Ang II⁴⁷¹.

Les tyrosines kinases Src engagent aussi des interactions avec plusieurs tyrosines kinases dont Pyk-2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) qui appartient à la famille des tyrosines kinases FAK (Focal adhesion kinase)⁴⁶⁸ (Figure 1.10). Ainsi, lors de son action hypertrophique, il est observé que l'Ang II recrute les tyrosines kinases de la famille Src afin d'induire Pyk2 qui est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette cellulaire. De plus, en présence d'une stimulation à l'Ang II, Pyk-2 qui possède une activité dépendante du Ca^{2+} , recrute c-Src afin d'induire le sentier de signalisation ERK1/2⁴⁷². Par ailleurs, l'action de Pyk2 peut aussi s'effectuer indépendamment de cette tyrosine kinase. Il demeure essentiel de souligner que la phosphorylation de Pyk-2 par l'Ang II a été associée à l'activation de la kinase p70S6 (Ribosomal S6 protein, de poids moléculaire de 70-kDa)⁴⁶⁸ qui constitue un événement cellulaire impliqué dans l'effet hypertrophique de l'Ang II.

L'Ang II génère de manière importante des dérivés oxygénés réactifs⁴⁶¹. Bien qu'il existe des évidences expérimentales suggérant une contribution importante du stress oxydatif à l'action de l'Ang II dans le remodelage vasculaire hypertrophique, cet aspect

a été jusqu'à présent très peu abordé à l'intérieur de cette thèse. Même si nous portons de l'intérêt pour les interactions neurohumorales (Ang II, NE et ET) et leur rôles dans le remodelage vasculaire hypertrophique, l'exploration du rôle du stress oxydatif dans l'influence neurohumorale s'établit au-delà du cadre du présent travail. Toutefois, il s'avère important de souligner que le stress oxydatif participe à la signalisation de l'Ang II (Figure 1.10). Dans ce contexte, il semble que l'activation de tyrosines kinases Src, par l'Ang II, induit la génération de dérivés oxygénés réactifs en stimulant l'enzyme NADPH oxydase retrouvée à la membrane cytoplasmique⁴⁷³. De même, il est démontré que c-Src se positionne en aval au stress oxydatif généré par l'Ang II et contribue aux voies de signalisation qui activent les mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie des CMLVs⁴⁷⁴.

La transactivation des récepteurs couplés aux tyrosines kinases

À la manière du positionnement des tyrosines kinases non-réceptorielles en amont dans la cascade de signalisations cellulaires, les récepteurs couplés aux tyrosines kinases sont aussi rapidement activés par l'Ang II afin d'induire l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLVs^{461, 475, 476} (Figure 1.10). La stimulation de ces récepteurs est produite de manière indirecte par l'Ang II. C'est-à-dire que l'Ang II, via l'activation de son récepteur AT₁, induit une phosphorylation du récepteur de l'EGF. Ce mécanisme est désigné par le terme transactivation. Au cours des dernières années, plusieurs agonistes couplés à des récepteurs à 7 passages transmembranaires ont été identifiés comme étant en mesure d'activer des récepteurs couplés aux tyrosines kinases, sans toutefois présenter une interaction entre un ligand et le récepteur dans la portion extra-cellulaire⁴⁷⁷. Outre l'Ang II, ces agonistes correspondent à la thrombine, l'acide lysophosphatidique (LPA), l'ET, le carbachol et la bombésine⁴⁷⁸. C'est principalement via l'action de récepteurs couplés aux protéines G que la transactivation est produite. Toutefois, il est possible que ce mécanisme soit induit par l'activation de récepteurs couplés aux tyrosines kinases, par l'activation de récepteurs aux cytokines et par l'adhésion des intégrines à la surface membranaire⁴⁷⁸. Dans la cadre de la présente thèse, notre intérêt pour la transactivation s'est orienté pour le récepteurs de l'EGF (epithelial growth factor). Par contre, il

demeure important de souligner que la transactivation peut aussi impliquer les récepteurs du PDGF (platelet growth factor) et de l'IGF (insulin growth factor)^{463, 477}.

Bien que la transactivation du récepteur de l'EGF a été décrite par plusieurs études, le ou les mécanismes sous-jacents à ce processus cellulaire demeure mal compris. Il est suggéré que des éléments de signalisation intra-cellulaires sont impliqués dans ce phénomène. La contribution des tyrosines kinases non-réceptorielles Src a été observée dans la transactivation du récepteur de l'EGF^{475, 479, 480}. Toutefois, le rôle de ces kinases semble être subtil. Il est suggéré que l'inhibition de cette famille de kinases n'empêche pas la transactivation, mais interfère avec le recrutement de la protéine adaptatrice Shc qui est impliquée dans la signalisation cellulaire induite par l'activation du récepteur de l'EGF⁴⁷⁷. Par ailleurs, une augmentation de Ca^{2+} intra-cellulaire a été rapportée comme un facteur important à la transactivation du récepteur de l'EGF^{463, 477}. Il est même suggéré suite à une dépolarisation membranaire qu'une entrée de Ca^{2+} , via un canal calcique dépendant du voltage, permet une activation du récepteur de l'EGF⁴⁸¹. De façon similaire, l'activation du récepteur AT_1 augmente la concentration du Ca^{2+} intra-cellulaire qui semble contribuer à la transactivation du récepteur de l'EGF. En ce sens, l'activité de certaines tyrosines kinases, telles Src et Pyk2, dépend de l'élévation du Ca^{2+} intra-cellulaire^{463, 477}. Toutefois, il existe des évidences qui suggèrent que leur activité n'est pas modulée par le Ca^{2+} ⁴⁶³. La production de dérivés oxygénés réactifs compte parmi les éléments de signalisation cellulaire important à la transactivation du récepteur de l'EGF⁴⁷⁹. D'ailleurs, il est suggéré que les tyrosines kinases Src et Pyk-2 agissent à titre de relais entre ces dérivés et la transactivation du récepteur de l'EGF. De plus, bien qu'il soit démontré qu'une élévation de la concentration de Ca^{2+} intra-cellulaire est nécessaire à cette cascade de signalisations, il est aussi possible qu'elle prenne place indépendamment du Ca^{2+} ⁴⁶³ (Figure 1.11). La PKC représente un autre facteur intra-cellulaire pouvant participer à la transactivation du récepteur de l'EGF induit par une stimulation au carbachol⁴⁸². Toutefois, cette observation a été faite dans une seule lignée cellulaire (HEK293), suggérant que la contribution de la PKC à la transactivation du récepteur de l'EGF est dépendante de conditions expérimentales bien précises.

La compréhension de la transactivation a donc suscité de nombreuses réflexions scientifiques⁴⁶¹. Au-delà des mécanismes intra-cellulaires discutés précédemment, un mécanisme différent, associé aux MMPs a aussi été suggéré afin d'expliquer la transactivation du récepteur de l'EGF par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, suite à l'action d'un agoniste, il est observé que les MMPs sont sécrétés dans l'espace extra-cellulaire afin de cliver la pro-HB-EGF (pro heparin-binding EGF) en une forme active (complexe actif de l'EGF lié à l'héparine). Par la suite, cette dernière stimule le récepteur de l'EGF localisé dans la membrane cytoplasmique⁴⁸³. Ce mécanisme a bien été démontré en présence d'une stimulation par l'ET et par la thrombine. Bien qu'il fut aussi observé en présence d'une stimulation par l'Ang II, une prévention de la transactivation du récepteur de l'EGF, suite à l'inhibition des MMPs, ne semble pas possible dans certaines études ayant utilisées des CMLVs⁴⁶³.

La transactivation du récepteur de l'EGF, associée à une stimulation du récepteur AT₁, représente un événement cellulaire essentiel à l'induction de la synthèse protéique *in vitro* dans une préparation de CMLVs ainsi qu'*in vivo* dans la paroi de l'aorte et d'artères de résistance chez le rat⁴⁷⁵. Comme il a été discuté plus tôt, la transactivation du récepteur de l'EGF nécessite l'induction de tyrosines kinases de la famille Src⁴⁷⁵. De plus, il semble que la transactivation de ce même récepteur induit l'activité de ces tyrosines kinases⁴⁸⁴. Les tyrosines kinases Src se positionnent donc en amont et en aval dans la transactivation du récepteur de l'EGF. De plus, en aval de ces éléments de la signalisation, les voies ERK 1/2 et PI3 kinase stimulent l'augmentation de la synthèse protéique associée à l'effet de l'Ang II dans une préparation *in vitro* de CMLVs⁴⁷⁵. L'inhibition de la transactivation du récepteur de l'EGF prévient l'activation de ces deux voies, suggérant que l'effet hypertrophique induit par l'Ang II dépend de la transactivation de ce récepteur. Au-delà de ces deux événements cellulaires, il est observé que la phosphorylation de ERK1/2 permet d'activer le facteur eIF-4E (eukaryotic initiation factor) qui correspond au facteur initiateur de la traduction et ainsi de la synthèse protéique⁴⁷⁶ (Figure 1.10). De façon similaire, l'activation du sentier de signalisation associé à PI3 kinase implique la phosphorylation de AKT et mTOR, deux effecteurs de ce sentier qui s'enchaînent afin de phosphoryler le facteur 4E-BP1 qui est

répresseur de l'activité de eIF-4E. Cette phosphorylation inhibe son action répressive et induit l'action de eIF-4E et ainsi la synthèse protéique. Il a été observé que l'inhibition de la transactivation du récepteur de l'EGF prévient la phosphorylation de eIF-4E, ce qui supporte la cascade illustrée à la figure 1.10.

La transactivation du récepteur de l'EGF constitue aussi un événement cellulaire très important à la prolifération des CMLVs⁴⁷⁵. En présence d'une stimulation de l'Ang II, l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription, tel c-fos, est prévenue suite à l'administration d'un inhibiteur de la transactivation du récepteur de l'EGF⁴⁸⁵. D'autre part, en présence d'une stimulation à l'Ang II, il est observé que l'expression accrue de c-fos est suivie d'une augmentation de la synthèse d'ADN dans une préparation de CMLVs provenant de patients hypertendus⁴⁷¹. Ainsi, ces résultats permettent de spéculer que la transactivation du récepteur de l'EGF constitue un événement situé en amont dans la cascade de la signalisation cellulaire associée à l'hyperplasie cellulaire induite par l'Ang II dans le contexte de l'hypertension.

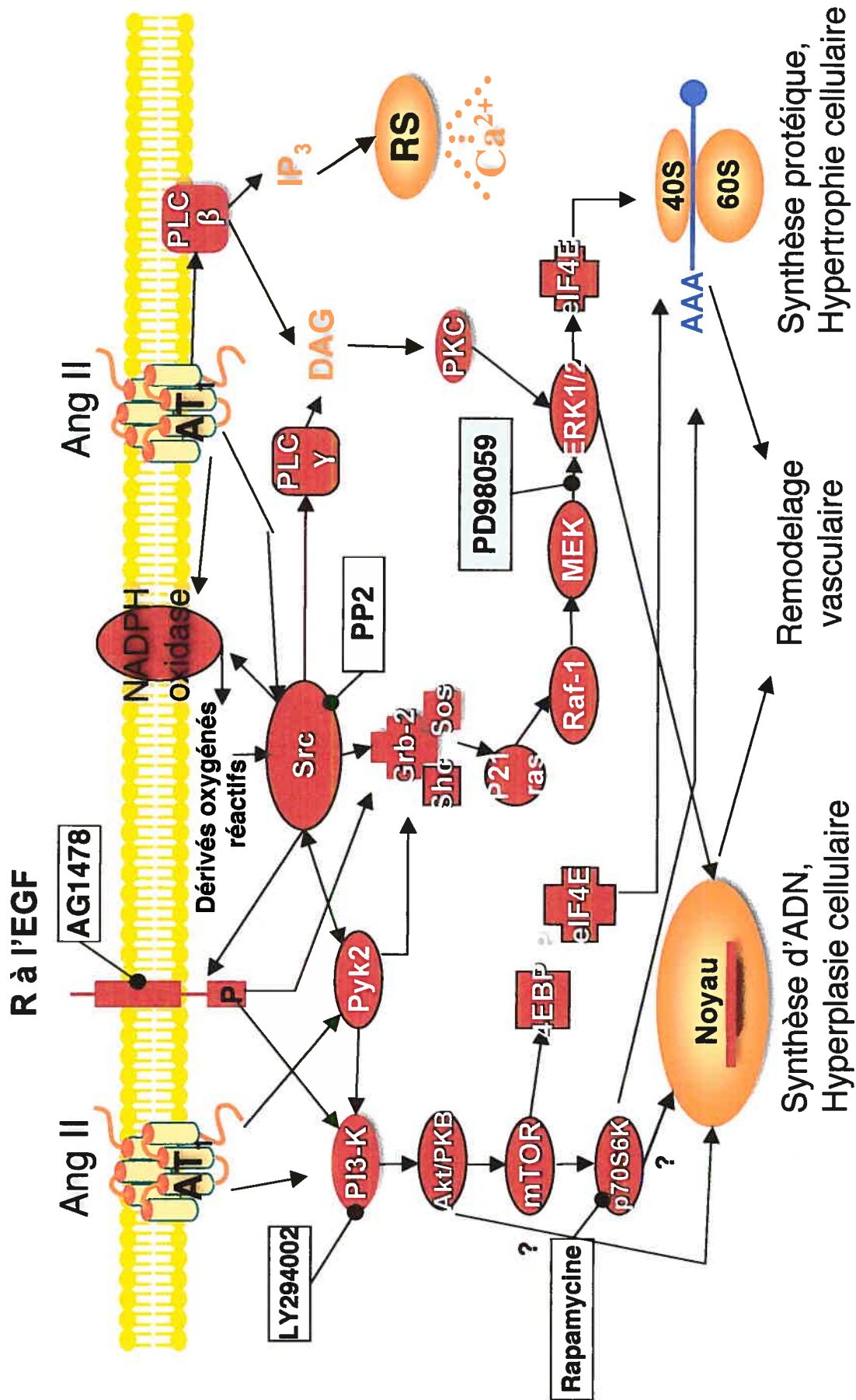
L'activation de la voie de signalisation de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase

Le rôle de l'enzyme PI3 kinase a été discuté précédemment à l'intérieur de cette section. Elle constitue une tyrosine kinase non-réceptorielle et participe à la régulation de la croissance des CMLVs⁹¹ (Figure 1.10). L'Ang II stimule, via son récepteur AT₁, l'activité de cette enzyme. De plus, de nombreuses cibles cellulaires sont induites, à la suite de l'activation de la PI3 kinase par l'Ang II⁹¹. Parmi les cibles qui sont induites, on retrouve la kinase sérine/thréonine Akt qui est aussi désignée par le terme protéine kinase B (PKB) (Figure 1.10). La protéine kinase mTOR (mammian target of rapamycin) se situe en aval dans cette cascade de signalisation et constitue un activateur de la p70S6 kinase (Figure 1.10). Ainsi, une inhibition pharmacologique du sentier de signalisation de la PI3 kinase prévient l'hypertrophie des CMLVs stimulée par l'Ang II⁴⁸⁶. Cet effet implique une chute de la phosphorylation de la P70S6 kinase, supportant l'idée que cette cible cellulaire se retrouve en aval dans la cascade de signalisation

induite par l'Ang II. Comme il a été discuté plus tôt dans cette section, les éléments de la signalisation cellulaire Akt et mTOR sont intimement associés à la synthèse protéique et ainsi à l'hypertrophie cellulaire^{476, 487}. Toutefois, la contribution de la p70S6 kinase au processus d'hypertrophie semble s'établir différemment. En présence d'une stimulation par l'Ang II, l'activation de la P70S6 kinase ne libère pas le facteur eIF4E qui induit la traduction⁴⁸⁷. Il est proposé que l'activité de la P70S6 kinase prendrait son importance dans l'hypertrophie des CMLVs en stimulant la synthèse des ribosomes qui est essentielle au mécanisme de la traduction⁴⁸⁸. Ainsi, la P70S6 kinase contribuerait à l'hypertrophie en stimulant la machinerie cellulaire nécessaire au processus de la synthèse protéique.

Il est aussi suggéré qu'une inhibition de la PI3 kinase supprime l'hyperplasie des CMLVs stimulées par l'Ang II⁴⁸⁹. Bien que Akt a été identifié en aval dans cette voie de signalisation et permet l'hyperplasie des CMLVs⁴⁷⁵, il semble moins concluant que la P70S6 kinase représente un événement cellulaire qui participe à cette voie de signalisation lors de l'hyperplasie cellulaire stimulée par l'Ang II⁴⁹⁰. Somme toute, des travaux supplémentaires pourraient être entrepris afin de mieux comprendre les événements contribuant à cette voie de signalisation.

Ces résultats dans leur ensemble démontrent de nombreuses interactions entre les éléments de la signalisation qui sont rapidement activés suite à la stimulation du récepteur AT₁. Ceci implique, des tyrosines kinases non-réceptorielles, la transactivation des récepteurs couplés aux tyrosines kinases et les dérivés oxygénés réactifs. De plus, en aval, les sentiers de signalisation de ERK 1/2 et de PI3 kinase semblent essentiels dans la modulation de la synthèse protéique et de la synthèse d'ADN des CMLVs. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'Ang II induit des mécanismes cellulaires hétérogènes, ce qui démontre la complexité de l'étude des sentiers de signalisation impliqués dans le remodelage vasculaire hypertrophique



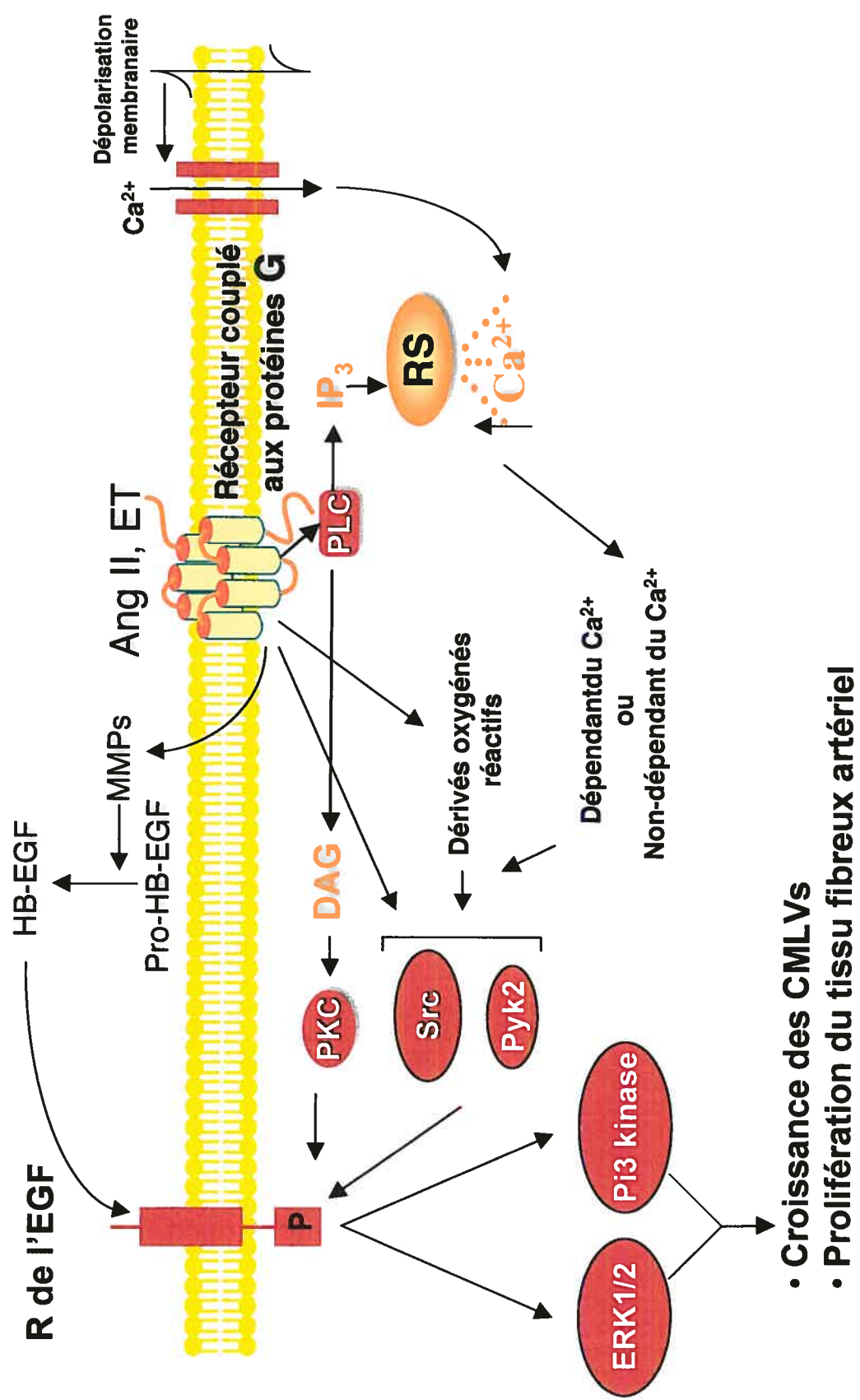


Figure 1.11 Signalisations cellulaires impliquées dans la transactivation du récepteur de l'EGF

1.5.2 La signalisation cellulaire de l'endothéline

Contrairement au nombre impressionnant de travaux qui ont permis de définir des sentiers de signalisations cellulaires associés à l'effet hypertrophique et hyperplasique de l'Ang II, un intérêt plus modeste a été porté à l'égard des sentiers de signalisation de l'ET. Des évidences expérimentales démontrent que l'ET induit des sentiers de signalisations fort semblables à ceux qui sont observés en présence d'Ang II.

L'activation du récepteur ET_A

Le sous-type ET_A prédomine au niveau des CMLVs⁴⁹¹, et c'est via son activation que l'effet vasoconstricteur de l'ET est produite. De façon similaire, l'action de l'ET dans la croissance de la paroi vasculaire semble s'établir préférentiellement via l'activation du récepteur ET_A.⁴⁹² Ainsi, considérant le rôle substantiel du récepteur ET_A, les sentiers de signalisations associés à l'activation de ce récepteur seront discutés (Figure 1.11).

Le récepteur ET_A fait partie de la famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G^{202, 492}. Plus précisément, ce récepteur est couplé à la protéine Gq qui à la suite de son activation permet le recrutement d'au moins 5 effecteurs, soit les phospholipases C, D et A₂, l'adénylate cyclase et les canaux calciques⁴⁹³. De la même façon que pour l'activation du récepteur AT₁, l'activation du récepteur ET_A recrute aussi la PLC qui, via la formation d'IP₃ et de DAG, permet une augmentation du Ca²⁺ intra-cellulaire ainsi qu'une activité accrue de la PKC. Ces événements cellulaires sont connus pour leurs effets dans la contraction des CMLVs. Toutefois, l'augmentation du Ca²⁺ intra-cellulaire et l'activation de la PKC participent aussi aux sentiers de signalisation cellulaires reliés aux effets hypertrophique et hyperplasique de l'ET^{492 491} (Figure 1.12).

Le sentier de signalisation cellulaire ERK 1/2

Il est rapporté qu'une stimulation de l'ET induit une augmentation de la synthèse protéique et une augmentation de la synthèse d'ADN en présence de CMLVs en culture^{491, 494}. Ces effets produits par l'ET impliquent l'activation d'événements cellulaires, dont les MAPKs⁴⁹³. Parmi les membres de cette grande famille, ce sont les kinases ERKs qui sont associées aux actions hypertrophique et hyperplasique de l'ET (Figure 1.12). De manière générale, l'activation du récepteur ET_A induit un site de reconnaissance pour le domaine SH2 de la protéine adaptatrice Shc. Cette dernière forme un complexe avec la protéine adaptatrice Grb2-Sos. L'activation de ce complexe permettra l'échange GDP/GTP qui activera la petite protéine G Ras. Sous une forme activée, elle induira une cascade d'activations qui implique les MAPKs Raf, MEK1/2 (kinase de ERK) et finalement ERK 1/2⁴⁹³. Ainsi, la stimulation de CMLVs par l'ET active le sentier ERK1/2 qui est associé à une augmentation de la synthèse protéique et à une augmentation de la synthèse d'ADN. En effet, en présence d'une inhibition de MEK1/2, ces deux effets sont prévenus. Toutefois, très peu d'évidences permettent d'établir, au-delà de l'activation de ERK1/2, les mécanismes exacts permettant à l'ET de stimuler la croissance des CMLVs.

Il est possible que l'ET via l'activation de la voie ERK1/2 stimule le facteur de transcription UBF (Upstream binding factor)⁴⁹⁵. Ce facteur constitue un activateur de la synthèse des ARNs ribosomiaux qui sont essentiels à la traduction des protéines. D'ailleurs, l'effet hypertrophique induit par l'ET en présence d'une culture de cardiomyocytes démontre une activation significative d'UBF, suggérant un rôle à ce facteur de transcription à l'effet de l'ET⁴⁹⁶. L'activation d'UBF a aussi été suggérée suite à une stimulation de l'ET dans la paroi d'artères de résistance (Blouin et col, résultats non-publiés). Toutefois, le sentier de signalisation ERK1/2 ne semble pas important à cet effet *in vivo*. L'activation du facteur UBF peut contribuer à l'action de l'ET, mais il est possible que ceci s'établisse via un sentier de signalisation autre que celui de ERK1/2, tel celui de la PI3 kinase⁴⁹⁷. Des travaux supplémentaires, *in vitro et in vivo*, seront nécessaires afin de bien caractériser le rôle véritable d'UBF suite à l'activation du sentier ERK1/2.

Par ailleurs, le rôle mitogénique de l'ET est controversé et il a souvent été affirmé que l'ET constitue un agent adjuvant à un autre facteur mitogénique²⁰². En raison de la variabilité des conditions expérimentales de cultures cellulaires et de la modulation de l'ET par la présence de facteurs de croissance, il est suggéré que l'ET, en soi, n'induit pas une prolifération des CMLVs⁴⁹⁸. Ainsi, une stimulation chronique à l'aide de l'ET a été produite dans une préparation de CMLVs en culture. Cette stimulation chronique (120 heures) à l'ET ne permet pas une activation de la voie de signalisation ERK1/2. Toutefois, l'ajout d'Ang II à la préparation permet une activation rapide de ERK1/2, suggérant que l'activation de ce sentier de signalisation par l'ET nécessite l'activité d'un autre facteur de croissance.

L'activation de ERK1/2 a souvent été associée aux effets produits par l'ET. Toutefois ceci pourrait être plus complexe que l'on croit. L'activation de ERK1/2 par l'ET nécessite la contribution d'événements cellulaires situés en amont dans la cascade de signalisation. Ceci pourrait correspondre à l'activité de certaines tyrosines kinases non-réceptorielles⁴⁹⁹, la transactivation du récepteur de l'EGF⁴⁹¹ et la production de dérivées oxygénées réactives⁴⁹⁴.

La participation des tyrosines kinases non-réceptorielles en amont dans la signalisation cellulaire de l'endothéline

Il demeure difficile d'établir une contribution de tyrosines kinases non-réceptorielles suite à une stimulation à l'aide de l'ET dans une préparation de CMLVs en culture (Figure 1.11). Toutefois, en présence de cardiomyocytes, il est observé que l'ET nécessite l'activation de c-Src afin d'induire les voies de signalisations impliquées dans l'hypertrophie cardiaque⁴⁹⁹. Il est aussi proposé que l'activation des tyrosines kinases Src et Pyk-2 contribue à l'activation de ERK1/2^{500, 501}. De plus, l'activation de la PKC constitue un événement essentiel au recrutement des tyrosines kinases non-réceptorielles afin d'induire ERK1/2. Ceci a été observé dans des cardiomyocytes et des cellules myométriales en culture. Ces résultats représentent les seules évidences suggérant une participation des tyrosines kinases non-réceptorielles à l'effet de l'ET.

La transactivation du récepteur de l'EGF, un événement intra-cellulaire important aux sentiers de signalisation de l'endothéline

Bien qu'une transactivation du récepteur de l'EGF soit observée dans une préparation de cardiomyocytes⁵⁰⁰, très peu d'évidences soutiennent le rôle de cet événement à l'action de l'ET dans des CMLVs. Sans discuter à nouveau des mécanismes associés à la transactivation du récepteur de l'EGF (Section 1.5.1), il s'avère essentiel de souligner certaines voies que l'ET nécessiterait pour la transactivation. Suite à l'activation de son récepteur ET_A, il est démontré que l'activité de MMPs serait impliquée dans la transactivation du récepteur de l'EGF (Figure 1.11)⁵⁰². Par ailleurs, il est aussi possible que des mécanismes intra-cellulaires soient nécessaires à l'ET afin d'induire la transactivation du récepteur de l'EGF⁴⁹¹. Ainsi, il est suggéré qu'une élévation du Ca²⁺ intra-cellulaire soit importante au processus (Figure 1.11). La PKC ne semble pas y participer. Toutefois, il est spéculé que Pyk-2, localisée en amont dans la signalisation cellulaire de l'ET, pourrait être un candidat au mécanisme de la transactivation du récepteur de l'EGF (Figure 1.11). L'administration d'un inhibiteur du récepteur de l'EGF (AG1478) altère la synthèse protéique, la synthèse d'ADN et la phosphorylation de ERK1/2 induite par l'ET. De façon similaire, à l'aide d'un modèle *in vivo* chez la souris, la transactivation du récepteur de l'EGF constitue un événement essentiel dans la production de tissus fibreux par l'ET dans la paroi aortique⁵⁰³. De plus, la transactivation du récepteur de l'EGF par l'ET nécessite aussi en aval dans cette cascade, l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 afin d'induire *in vivo* la synthèse de tissus fibreux aortique⁵⁰³. Bien qu'il existe peu d'évidences *in vitro* et *in vivo* suggérant une participation de la transactivation du récepteur de l'EGF à l'effet de l'ET, les quelques évidences présentées suggèrent un rôle et permettent de spéculer que ce mécanisme est important au développement du remodelage vasculaire produit par l'ET.

Le sentier de signalisation de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase

La contribution du sentier de signalisation de la PI3 kinase a été peu analysée à l'égard de l'ET et de son rôle dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Néanmoins, il est proposé qu'une activation de la PI3 kinase est nécessaire à l'ET afin d'induire la

prolifération de fibroblastes en culture⁵⁰⁴. À l'aide de cellules ovariennes de hamster ainsi qu'à l'aide de cellules mésangiales glomérulaires de rat, une contribution de la voie PI3 kinase a été identifiée dans la prolifération induite par l'ET. De plus, à l'aide de ce deuxième type cellulaire, il est observé qu'une stimulation chronique de 26 heures à l'ET implique la voie ERK1/2 dans une phase précoce de la stimulation et la voie PI3 kinase dans une phase tardive de la stimulation. Le recrutement du sentier PI3 kinase pourrait permettre l'activation d'événements cellulaires, tels Akt, mTOR ainsi que P70S6 kinase et produire une hypertrophie cellulaire, car ils ont été démontrés importants lors de l'augmentation de la synthèse ribosomale⁵⁰⁵ (Figure 1.12).

Bien que ces observations mécanistiques, sous-jacentes à l'action cellulaire de l'ET ont été observées à l'aide de cellules glomérulaires en culture, il s'avère possible que l'ET stimule aussi le sentier de signalisation de la PI3 kinase au niveau vasculaire afin d'induire une hypertrophie de la paroi artérielle. En ce sens, il est rapporté que l'ET active le sentier de la PI3 kinase dans une préparation de CMLVs⁴⁹¹. Plus précisément, une phosphorylation de la p70S6 kinase est induite par la stimulation à l'aide de l'ET. Par ailleurs, une administration de rapamycine, un inhibiteur de mTOR, prévient son activation ainsi que l'augmentation de la synthèse protéique et l'augmentation de la synthèse d'ADN induite par la stimulation à l'aide de l'ET⁴⁹¹.

Ces résultats dans leur ensemble démontrent l'activation rapide d'éléments de la signalisation suite à la stimulation du récepteur ET_A. À l'exemple des observations rapportées avec l'Ang II, les sentiers de signalisation associés à ERK1/2 et à PI3 kinase sont aussi induits en aval dans la signalisation de l'ET. Toutefois, la signalisation cellulaire de l'ET concernant le remodelage vasculaire hypertrophique demeure peu explorée et des travaux devront être poursuivis afin de mieux caractériser les événements intra-cellulaires impliqués dans l'action de l'ET.

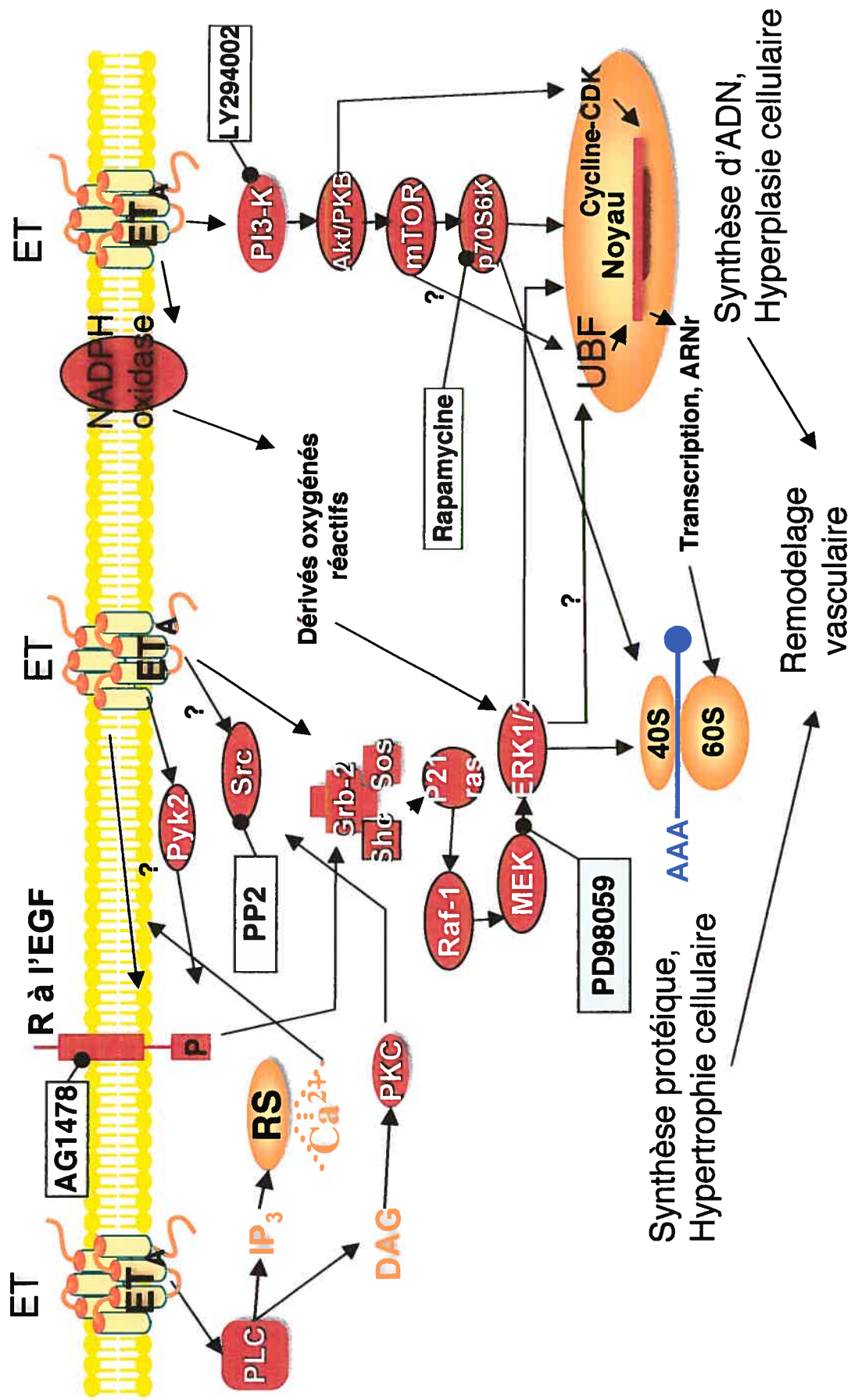


Figure 1.12 Signaux cellulaires impliqués dans le remodelage vasculaire hypertrophique induit par l'endothéline

1.6 HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE

Dans l'hypertension artérielle plusieurs systèmes neurohumoraux tel le SRA et le SNS deviennent anormalement activés et interagissent avec des médiateurs vasculaires locaux afin d'induire le développement de complications associées à cet état physiopathologique. Dans ce contexte, il a été observé que l'ET constitue un médiateur important à l'hypertrophie vasculaire produite par l'Ang II et la NE. De plus, selon le territoire vasculaire étudié, le remodelage vasculaire implique des mécanismes distincts. La première hypothèse de cette thèse est que l'ET, dans l'induction précoce du remodelage vasculaire, n'interagit pas de la même manière avec le SRA et le SNS dans les artères de conductance et de résistance. L'ET serait en aval dans la cascade d'interactions impliquées dans le remodelage des petites artères de résistance, toutefois plusieurs évidences laissent prétendre que ce n'est pas le cas dans les artères de conductance.

Il a aussi été démontré que l'Ang II et l'ET activent une panoplie de protéines kinases afin d'induire ses effets physiologiques. La deuxième hypothèse de cette thèse est que les tyrosines kinases de la famille Src constituent des éléments de signalisations cellulaires essentiels dans la production de l'ET et dans l'effet de l'ET dans la cascade Ang II – ET – synthèse protéique vasculaire des petites artères de résistance. De plus, la troisième hypothèse de cette thèse est que la transactivation du récepteur de l'EGF contribue, *in vivo*, en aval de l'ET, à l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire des artères de résistance.

1.7 OBJECTIFS GÉNÉRAUX

L'objectif général de cette thèse est d'étudier le rôle central de l'ET dans le remodelage vasculaire hypertrophique associé à l'hypertension artérielle. Dans un premier projet, les mécanismes initiaux du remodelage vasculaire hypertrophique ont été évalués. La synthèse protéique vasculaire a donc été utilisée comme indice précoce du remodelage vasculaire. Sachant que le remodelage hypertrophique s'établit au cours d'une période de 2 à 4 semaines, les changements de synthèse protéique vasculaire ont été évalués très tôt, au cours des 26 premières heures de stimulation. Ceci a été étudié dans l'aorte et dans les petites artères mésentériques suite à une stimulation *in vivo*, par l'Ang II, par la NE et par l'ET. Le but était d'évaluer la cascade d'interactions entre le SRA, le SNS et l'ET impliquée dans l'induction du remodelage des artères de conductance et de résistance. À cette fin, un antagoniste des récepteurs AT_1 , α_1 et ET_A a été administré en présence des différentes stimulations (Ang II, NE et ET).

L'ET constitue un médiateur essentiel à l'action hypertrophique de l'Ang II dans les petites artères de résistance. Certaines protéines kinases, comme celles de la famille Src et des facteurs de croissance (PDGF, IGF et EGF) contribuent à la signalisation cellulaire de l'Ang II et de l'ET. On ignore toutefois la nature des intermédiaires qui permettent l'interaction entre le SRA et l'ET dans le remodelage hypertrophique des petites artères de résistance *in vivo*. Le deuxième objectif de cette thèse a été d'évaluer, *in vivo*, la position des tyrosines kinases de la famille Src dans l'interaction Ang II - ET – synthèse protéique vasculaire. La transactivation du récepteur de l'EGF est un événement cellulaire essentiel dans l'induction de la synthèse protéique vasculaire par l'Ang II. Ainsi, le troisième objectif de cette thèse a consisté à établir le rôle de la transactivation du récepteur de l'EGF dans l'interaction Ang II – ET – synthèse protéique vasculaire, tout spécialement en aval de l'ET.

CHAPITRE 2 :

Heterogeneity in the Acute Control of Vascular Protein Synthesis In Vivo

Journal of Vascular Research, 2003; 40: 123-131
(voir Annexe)

^aPierre Beaucage, ^aNobuharu Yamaguchi, ^bRichard Larivière and ^aPierre Moreau

^aFaculté de pharmacie, Université de Montréal et ^bCentre de recherche de l'Hôtel-Dieu
de Québec, Université Laval, Québec

Short title: Control of vascular protein synthesis

Financial support: This work was supported by grants from Knoll AG, Germany and
the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). PM is a scholar from CIHR.

Correspondence:

Pierre Moreau, Ph.D
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
PO Box 6128, Station Centre-ville
Montréal, Qc, Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 (3342)
Fax: (514) 343-2102
e-mail: [REDACTED]

2.1 ABSTRACT

In response to both hemodynamic and neurohumoral changes, the cardiovascular system remodels and this process could contribute to end-organ damage. The aim of this study was to determine the early in vivo interactions between three systems known to contribute to vascular hypertrophic remodeling, in conduit and resistance arteries. Exogenous angiotensin II, norepinephrine and endothelin-1 administration elevated protein synthesis in the aorta and in small mesenteric arteries. In small arteries, the effect of angiotensin II was blocked by AT1, α -adrenergic and endothelin receptor antagonists, while only the α -adrenergic and endothelin receptor antagonist inhibited the effect of norepinephrine. Moreover, only the endothelin receptor antagonist significantly blunted the effect of exogenous endothelin on protein synthesis. In the aorta, the stimulation of angiotensin II on protein synthesis was also inhibited by the three antagonists. However, only the α -adrenoceptor antagonist blunted the response to norepinephrine and the three antagonists prevented endothelin-induced elevation of protein synthesis. The blood pressure effects of the drugs did not correlate with their capacity to stimulate or inhibit vascular protein synthesis. In conclusion, interactions in the control of protein synthesis are heterogeneous along the vascular tree. In small arteries, the interaction is linear with endothelin as the downstream effector. In the aorta, the local sympathetic nervous system appears to control protein synthesis. The heterogeneity in downstream effectors should be considered in studies investigating signaling events related to protein synthesis, which is used as an early marker of hypertrophy.

Keywords: Renin angiotensin system, Angiotensin II, Sympathetic nervous system, Norepinephrine, Endothelin, Hypertrophy, Vascular remodeling

2.2 INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are associated with enhanced activity of numerous regulatory entities such as the sympathetic nervous system (SNS), the renin angiotensin system (RAS) and the endothelin (ET) system. These systems, although acutely beneficial, are thought to become deleterious when chronically activated. Cardiovascular remodeling represents one of the facets by which these systems could alter circulatory integrity [1, 2]. Hypertrophic remodeling is a generic term used to describe increased cross-sectional area (CSA) of arteries and it seems to proceed either through growth (actual hypertrophy) or proliferation (hyperplasia). Infusion of exogenous Ang II leads to an increase of media thickness, media/lumen ratio and cross-sectional area of small arteries, by increasing cell size [3, 4], or cell replication in some cases [5]. The same stimulus leads to aortic hypertrophy by increasing protein and DNA synthesis *in vivo* [6, 7]. Furthermore, Ang II enhances protein synthesis *in vivo* in small and large arteries, a process required for both hypertrophy and hyperplasia [8, 9]. The sympathetic nervous system is also a potent modulator of vascular remodeling. Inward hypertrophic remodeling (true hypertrophy) of small mesenteric arteries has been reported following chronic NE administration [10]. In the aorta, the same treatment induced medial hyperplasia that lead to structural changes [11]. Thus, different types of arteries can remodel through different mechanisms (hypertrophy or hyperplasia) when exposed to similar environments. Since remodeling represents the final integration of protein synthesis, mitosis and apoptosis signals [1, 2], distinct interactions between key regulatory systems may operate in different types of arteries.

Endothelin (ET) appears as a necessary intermediate in the hypertrophic remodeling of small arteries stimulated by Ang II [12], NE [10], aldosterone [13] or vasopressin [14]. Indeed, ET is overexpressed in the vascular wall of small arteries and receptor antagonists (ETRA) are effective to prevent vascular hypertrophy, often in a pressure-independent fashion (see [15] for a review). The role of ET in conduit artery remodeling is less well characterized. Overall, the studies suggest that ETRA can regress aortic

hypertrophy induced by exogenous Ang II or NE, or in the DOCA-salt hypertension model [11, 16, 17].

The aim of this study was to investigate the interaction between the SNS, the RAS and ET in the control of vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries to elucidate a potential mechanism by which the remodeling discrepancy in these vessel types could be explained. Studying early interactions could help to elucidate key events that will dictate the development of the remodeling process and not its maintenance, as most chronic studies tend to address. Indeed, we have previously shown that ET is transiently involved in small artery remodeling [10], adding support to the concept that early and late events may not proceed similarly. To do so, protein synthesis was measured in conduit and small arteries at the end of the first 24 hours of *in vivo* stimulation with Ang II, NE or ET alone or with appropriate antagonists.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Surgical procedures and treatments

Male Sprague-Dawley rats (300-400g) were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) for implantation of polyethylene catheters in the femoral artery and vein. Tubing was tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected by a tethering system. Vascular protein synthesis was induced by implanting an osmotic pump (model 1003D Alzet) releasing a constant dose of Ang II (400 ng/kg/min, s.c., n=27 [9]), NE (2,5 ug/kg/min, s.c., n=24 [10]) or ET (5 pmol/kg/min, i.p., n=24 [18]). Dosages were selected from pilot studies to stimulate protein synthesis, with minimal impact on blood pressure. Control rats were sham operated but pumps were not implanted (n=14: 8 for NE and Ang II and 6 for studies with ET). In subgroups of treated rats, irbesartan (15 mg/kg; a selective AT₁-receptor antagonist), darusentan (LU135252, 10 mg/kg; a selective ET_A-receptor antagonist) or prazosin (1mg/kg; an α -adrenoceptor antagonist) was administered subcutaneously twice, 12 hours apart starting at the time of osmotic pump implantation. Twenty-two hours after surgery an i.v. L-(4,5-³H)leucine infusion was started for a period of four hours (12 μ Ci/hr) to allow quantification of protein synthesis in all rats. Number of rats for individual groups are presented in table 1. Arterial pressure and heart rate were also recorded during the infusion of leucine through the arterial catheter. The protocols were approved by the Animal Care Committee of our institution.

2.3.2 Protein Synthesis Measurement

Protein synthesis measurement was done as previously described and validated [8, 9]. Briefly, at the end of the leucine infusion, animals were sacrificed (anesthesia and exsanguination) and the aorta and small mesenteric arteries (arteries branching from, but excluding the superior mesenteric artery and extending to the intestine, from 350 to less than 100 μ m of internal diameter) were harvested and rapidly frozen. Frozen tissues were powdered in liquid nitrogen and proteins were precipitated overnight in trichloroacetic acid (TCA; 10%), washed once with TCA (10%) and twice with water. Tissues were

solubilized with KOH at 45°C for three hours. For each tissue, 15 µl of the final solution was used for measurement of protein concentration by the method of Lowry [19], and 1ml to measure the incorporation of labeled leucine in newly synthesized proteins by scintillation counting. Data are expressed as cpm/mg of proteins, which represents the vascular protein synthesis rate.

2.3.3 Catecholamine, plasma renin activity and ET measurements

Nineteen additional Sprague-Dawley rats were catheterized and osmotic pumps releasing Ang II, NE or ET, were implanted subcutaneously or intraperitoneally, as described above. Twenty-four hours later, blood samples were collected through the arterial catheter. One ml of blood sample was withdrawn for plasma catecholamine measurements in tubes containing a preservative solution of ethylene glycol bis, (aminoethylether)tetra-acetic acid, reduced glutathione, sodium hydroxide and HPLC grade water. Samples were then centrifuged at 15 000 g for 5 min and plasma collected. Concentration determination was performed by HPLC, as previously described [20]. Another mL was collected in tubes containing 20 µl of an EDTA solution (20mg/mL). The samples were centrifuged at 15 000 g for 5 min and plasma renin activity (PRA) was assessed on plasma by a commercial radioimmunoassay kit (New England Nuclear, Boston, USA). Finally, a third mL was collected in the presence of EDTA and used to measure ET levels by radio-immuno assay as previously described [21].

2.3.4 Drugs and Statistical Analysis

Ang II, NE and prazosin were purchased from Sigma-Aldrich, while ET was provided by Calbiotech. Irbesartan was a gift from Bristol-Myers Squibb (Montreal, Canada) and darusentan (formerly LU135252) was kindly provided by Knoll-BASF Pharma (Ludwigshaven, Germany). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were selected *a priori* and performed using Bonferroni's correction: the control group was compared with Ang II, NE and ET groups. The Ang II group was compared with Ang II + Irbesartan, Ang II + Prazosin and Ang II + darusentan. Similar comparisons were

chosen for the NE and the ET groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

2.4 RESULTS

2.4.1 Hemodynamic Measurements

Stimulation with Ang II for a 24-hour period increased DBP, SBP and MBP, as compared to the control group (**Table 1**). Irbesartan significantly reduced those values, while darusentan had no significant effect. Prazosin only reduced DBP significantly. The doses of exogenous NE and ET had no significant effect on pressure parameters. Irbesartan also reduced blood pressure in NE and ET-treated rats (only SAP was significant for ET). Prazosin significantly reduced SBP in ET-treated animals. Exogenous NE administration elevated heart rate and this effect was blocked only by prazosin (**Table 1**).

2.4.2 Protein Synthesis

In mesenteric arteries, basal protein synthesis was 412 ± 15 cpm/mg, which was elevated by 35% with Ang II infusion, by 67% with NE and by 58% with ET stimulation (**Figure 1**). With Ang II as the agonist, treatment with an AT_1 , ET_A or α -adrenoceptor antagonist prevented the elevation of protein synthesis. With NE, the administration of ET_A and α -adrenoceptor antagonists were effective, while the AT_1 antagonist produced a small and not significant decrease. With ET as the agonist, only the ET_A antagonist prevented significantly the elevation of protein synthesis, while the effect of AT_1 and α -adrenoreceptor antagonists did not reach statistical significance.

In aortas, basal protein synthesis was 251 ± 19 cpm/mg. This rate was elevated by 69% with Ang II stimulation, 83% with NE and 25% with ET ($p < 0.05$, **Figure 2**). As in mesenteric arteries, the elevation of protein synthesis induced by Ang II was blunted in the presence of the three antagonists. However, only the α -adrenoceptor antagonist

prevented the effect of NE on protein synthesis. As with Ang II stimulation, the effect of ET on protein synthesis was blocked by all three antagonists.

2.4.3 PRA, catecholamine and ET levels

Measurement of PRA indicates that the doses of NE and ET chosen did not influence the release of renin (**Table 2**). As expected, administration of Ang II inhibited renin release through its negative feedback mechanism. The administration of NE increased significantly its plasma levels. Although ET had no effect on plasma NE levels, Ang II had a tendency to elevate its level. The three agonists did not influence the plasma levels of epinephrine, an index of adrenomedullary release of catecholamines. Finally, exogenous administration of ET doubled its plasma levels, while Ang II and NE had no effect.

2.5 DISCUSSION

In this study, we explored early growth interactions between RAS, SNS and ET, using an *in vivo* model of protein synthesis measurement. From our results, it appears that the aorta and small mesenteric arteries use a different pattern of local recruitment for their protein synthesis regulation. In resistance arteries, the RAS seems to be upstream in the cascade of interactions, activating the local SNS, which, in turn, triggers the release of ET to produce protein synthesis. However, in conduit arteries, the local SNS appears to be the final system dictating the growth process.

2.5.1 Small arteries

Vascular hypertrophy of resistance arteries has been described following chronic Ang II stimulation and this effect is at least partly pressure-independent [4, 12, 22]. Hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMC) requires an acceleration of protein synthesis and our results confirm our previous reports of enhanced protein synthesis after 24 hours of stimulation with Ang II *in vivo* [8, 9]. As expected, the effect of Ang II was inhibited by irbesartan, a selective antagonist of AT₁ receptors [23]. However, the effect of Ang II was also completely inhibited by antagonists of α -adrenoceptors and ET receptors *in vivo*, suggesting that these systems were recruited to accelerate protein synthesis. Interactions between Ang II and the SNS are well known and of particular relevance is the amplifying effect of Ang II on NE release by sympathetic fibers [24]. Our simple evaluation of NE spillover by measurement of its circulating levels suggest that Ang II could cause a local facilitation of NE release, although the elevation did not reach significance. Nonetheless, the blockade of protein synthesis by prazosin strongly supports a role of NE in the *in vivo* action of Ang II in small mesenteric arteries.

Angiotensin II has also been reported to enhance the production of ET by endothelial cells [25] and VSMC [26]. This translates into elevation of vascular concentrations of ET during chronic Ang II administration [12]. Our results confirm that the plasma levels of the peptide do not increase following Ang II administration [27], most probably since

the release of ET is preferably abluminal [28]. In chronic conditions *in vivo*, an ET receptor antagonist totally prevented the vascular hypertrophy elicited by Ang II [12]. Thus our present results in an earlier phase are in agreement with this longer study by showing that Ang II requires the involvement of ET to trigger protein synthesis in the wall of small mesenteric arteries.

Twenty four hours of NE administration lead to a marked elevation of protein synthesis in small mesenteric arteries. These new results are in line with our previous study showing that chronic exogenous NE administration leads to hypertrophic remodeling of small arteries [10]. The response has been attributed to α -adrenergic stimulation [10, 29], which was confirmed in this study. Furthermore, we have previously reported that blockade of ET receptors blunts the development of hypertrophy induced by NE [10]. Again, these results obtained in chronic conditions were reproduced in our acute model, whereby darusentan prevented NE-induced elevation of protein synthesis. In spite of the fact that we did not observe an enhancement of plasmatic ET concentrations, it is possible that the tissue concentrations of ET were augmented thus explaining the prevention of hypertrophy in mesenteric arteries with the ETRA. Indeed, catecholamines can acutely stimulate the release of ET by cultured endothelial cells [30] and in vascular [10] and ventricular tissue [31] *in vivo*.

Irbesartan, the AT₁ receptor antagonist, was unable to blunt the accelerated protein synthesis produced by NE stimulation. These results, combined with those obtained with Ang II as the agonist and prazosin as the antagonist, suggest that NE operates downstream of Ang II. Apparently, few studies have looked at the implication of the RAS in NE induced vascular hypertrophy in resistance arteries and our results suggest that a local RAS system would not be activated in the control of hypertrophy during SNS activation. Furthermore, since PRA was not changed following NE administration, the circulating RAS was clearly not activated. Considering that the local vascular renin activity was reported to be dependent on circulating renin [32], it is consistent with a lack of local RAS activation.

Although, many studies have observed a participation of ET in vascular remodeling, few publications have studied vascular remodeling following exogenous ET administration. Preliminary results in our laboratory suggest that chronic ET administration at the same dosage for 28 days leads to small artery hypertrophy (Cross sectional area in calcium-free perfused and pressurized conditions: $26.4 \pm 2.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs Control: $11.7 \pm 1.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $P < 0.05$, Dao & Moreau 2002, unpublished observations). In line with those results, 24 hours of exogenous ET enhanced protein synthesis in mesenteric arteries, which was blunted only by the ETRA. Although antagonists of the RAS and SNS tended to have an inhibitory effect, it did not reach significance. Furthermore, the lack of changes in PRA and circulating NE level suggest that the systems were not globally affected at the dose of ET used in this study. Thus, ET does not seem to require a significant involvement of the RAS nor of the SNS to accelerate protein synthesis in small arteries.

Overall, our results point to a linear type of interaction in the control of protein synthesis in small arteries, whereby Ang II recruits NE that, in turn requires ET. Thus, in pathological conditions characterized by the activation of one or several regulatory systems, ET would represent a key mediator of small artery hypertrophy, at least in the early phase of the disease process.

2.5.2 Conduit Arteries

Ang II stimulation enhanced aortic protein synthesis, which is in line with the observation of vascular wall hypertrophy in chronic conditions [6, 7]. Similarly to the results presented for mesenteric arteries, Ang II-stimulated vascular protein synthesis implicated NE and ET-1 in the aorta as well, since their specific antagonists significantly blunted the response. Catecholamines, through α -adrenoceptors, have been shown to contribute to the mitogenic effect of Ang II in conduit arteries in vivo [33]. This could help to resolve the discrepancy that Ang II mainly acts as a trophic factor in vitro [34, 35], but could induce hyperplasia (or at least polyploidy) in vivo [7], since the final

effect would be carried out by the SNS. Indeed, chronic NE administration leads to aortic hyperplasia [11].

Prazosin, an α -adrenoceptor antagonist, was the only treatment to prevent NE-induced enhancement of protein synthesis in the aorta. Indeed, treatment with an AT_1 antagonist or an ETRA had no effect on the response to NE. The results with the ETRA contrast those obtained in small arteries and suggest a different local interaction between the three systems. Interestingly, we reported in a previous study, that an ETRA regressed chronic NE-induced aortic hyperplasia of aortic vascular wall [11]. However, the same antagonist was unable to prevent the development of hyperplasia (Dao & Moreau, unpublished observations), suggesting that ET may have a role in the maintenance of hyperplasia (potentially by limiting apoptosis) but not in its development in large arteries.

The effect of exogenous ET on aortic protein synthesis was more modest than that of NE and Ang II. The difference could be attributable to the site of ET administration (i.p. vs s.c.) that was chosen to observe enhanced mesenteric protein synthesis reliably with this peptide. Indeed, subcutaneous administration of the same subpressor dose of ET had no significant effect on protein synthesis (aortic and mesenteric), potentially due to poorer diffusion and/or important systemic metabolism. Both an AT_1 receptor and an α -adrenoceptor antagonist significantly prevented this elevation of protein synthesis, in contrast to the results presented in small arteries. This observation suggests an involvement of the local RAS and SNS with exogenous ET administration, as PRA and circulating NE levels were not modified. It is not clear by which mechanism ET could activate those systems locally. It has been suggested that ACE activity increased after the addition of ET-1 to VSMC in culture [36]. It is also possible that voltage-operated calcium channels were activated by exogenous ET and amplified the biological effects of NE and Ang II, as it was proposed for NE-induced vasoconstriction [37, 38]. Whatever the mechanisms, they would have to be selective for conduit arteries to explain the difference between the two vascular beds.

To summarize our observations in conduit arteries, the local interactions regulating protein synthesis in the aorta appear to point to the local SNS as the central effector. Interestingly, Ang II and ET show mutual positive interactions to induce protein synthesis through SNS activation, suggesting a more complex scheme of relationships than in smaller arteries.

2.5.3 Hemodynamic influences

Increase in pressure is known to activate signaling cascades that could lead to protein synthesis, in addition to a direct effect of the agonists used [39]. It was clearly not the case for NE and ET that did not produce significant pressure changes. Interestingly, Mortensen et al have previously shown that 5 pmol/kg/min of ET-1 elevates arterial pressure by 20-25 mmHg [18], but the peptide was administered i.v. and not i.p. as in this study. Angiotensin II significantly elevated pressure and this mechanism could have contributed to enhance vascular protein synthesis, although several reports have suggested pressure-independent modulation of remodeling by Ang II [4, 12, 22, 40].

Antagonists could also influence protein synthesis indirectly by reducing arterial pressure. Interestingly, irbesartan reduced pressure in NE-treated rats, but was without significant effect on NE-induced protein synthesis. In addition, the significant effect of prazosin and darusentan on Ang II-induced protein synthesis does not appear to be related to blood pressure lowering, which was not significant for darusentan and borderline for prazosin. It must be noted, however, that pressure was measured only in the aorta and not at the level of small mesenteric arteries, thus weakening our interpretation in this vascular bed.

2.6 CONCLUSION

In this study we evaluated the early events of vascular hypertrophy/hyperplasia by measuring changes of protein synthesis following 24 hours of Ang II, NE or ET stimulation. The results presented are in complete agreement with observations from

chronic studies, when available, suggesting that the model is a good predictor of long-term vascular remodeling. Accordingly, stimulation with Ang II, NE or ET enhanced vascular protein synthesis in small mesenteric and conduit arteries. The flexibility of this *in vivo* model allowed us to study specific interactions in the control of vascular remodeling simultaneously in two types of arteries. Agonists mimicked activation of endogenous systems as in pathological conditions, while antagonists blocked the endogenous contribution of the systems. Different schemes of interaction between the RAS, the SNS and ET appear to exist between small and conduit arteries. Indeed, among the three agonists, ET seems to be the downstream effector in small arteries, with other agonists feeding at different levels of the cascade: Ang II more upstream and NE intermediate. In conduit arteries, Ang II and ET interact mutually and require the involvement of NE to induce protein synthesis. The reason for the heterogeneity is not clear, but may be related to a different composition of the vascular wall, as our evaluation did not dissect out the effect in the three vascular tunica. In fact, since the adventitia can also contribute to the global remodeling, our overall assessment of vascular protein synthesis may better predict final hypertrophic remodeling, than studying VSMC alone. Our results also imply that the more downstream a system is, the more chances its antagonist will have to prevent vascular hypertrophy if several systems are activated in a pathological conditions.

One limitation of our study is that the experiments performed in the early stage of remodeling do not allow differentiating future hypertrophy from hyperplasia. Indeed, this information normally requires long-term studies to determine cell number and have been performed for most agonists. In fact, the tendency for large arteries to demonstrate hyperplasia and of small arteries to show hypertrophy with these agonists may be related to the distinct downstream effector identified in this study: NE in conduit and ET in small arteries. Considering the numerous clinical conditions showing activation of one or more of the systems, the interactions reported provide the necessary background work to study the molecular mechanisms involved in protein synthesis, by using relevant downstream agonists in different vascular beds.

Acknowledgements

We thank Mrs. Louise Ida Grondin and Sanaë Yamaguchi for their excellent technical assistance.

2.7 REFERENCES

1. Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-1438.
2. Hamet P, deBlois D, Dam T-V, Richard L, Teiger E, Tea B-S, Orlov SN, Tremblay J: Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1996;74:850-861.
3. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension: Dual process of remodelling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-397.
4. Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-635.
5. Su EJ, Lombardi DM, Wiener J, Daemen MJ, Reidy MA, Schwartz SM: Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998;82:321-7.
6. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P: Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 1996;28:153-158.
7. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-6.
8. Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S: Egf receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C446-55.
9. Martens FMAC, Demeillers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P: Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition (role of extracellular signal-regulated kinases 1/2). *Hypertension* 2002;39:16-21.

10. Dao HH, Martens FMAC, Larivière R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *Journal of Hypertension* 2001;19:1-12.
11. Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P: Norepinephrine - induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelium-dependent. *Journal of Hypertension* 2001;19:1965-1973.
12. Moreau P, d'Uscio L, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: Reversal by ET-A receptor antagonist. *Circulation* 1997;1593-1597.
13. Park JB, Schiffrin EL: Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: Role of endothelin-1. *Am J Hypertens* 2002;15:164-9.
14. Intengan HD, He G, Schiffrin EL: Effect of vasopressin antagonism on structure and mechanics of small arteries and vascular expression of endothelin-1 in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension* 1998;32:770-7.
15. Dao HH, Moreau P: An update on the status of endothelin receptor antagonists for hypertension. *Expert Opinion on Invertigational Drugs* 2001;10:1937-1946.
16. Herizi A, Jover B, Bouriquet N, Mimran A: Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin ii by endothelin blockade. *Hypertension* 1998;31:10-14.
17. Sharifi AM, Schiffrin EL: Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: Effect of endothelin receptor antagonism. *Journal of Hypertension* 1997;15:1441-1448.
18. Mortensen LH, Pawloski CM, Kanagy NL, Fink GD: Chronic hypertension produced by infusion of endothelin in rats [published erratum appears in *hypertension* 1990 aug;16(2):212]. *Hypertension* 1990;15:729-33.
19. Lowry O, Rosenbrough N, Lewis Far A, Randall R: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
20. Yamaguchi N: In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by non-nicotinic mechanism: Local medullary effect of vip. *Am J Physiol* 1993;265(34):R766-R771.
21. Larivière R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D: Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *American Journal of Hypertension* 1998;11:989-997.

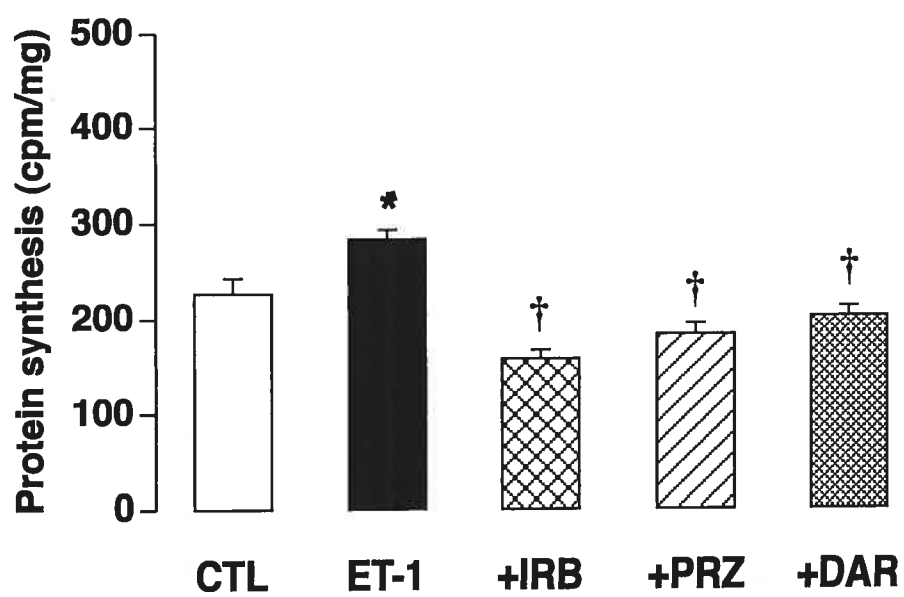
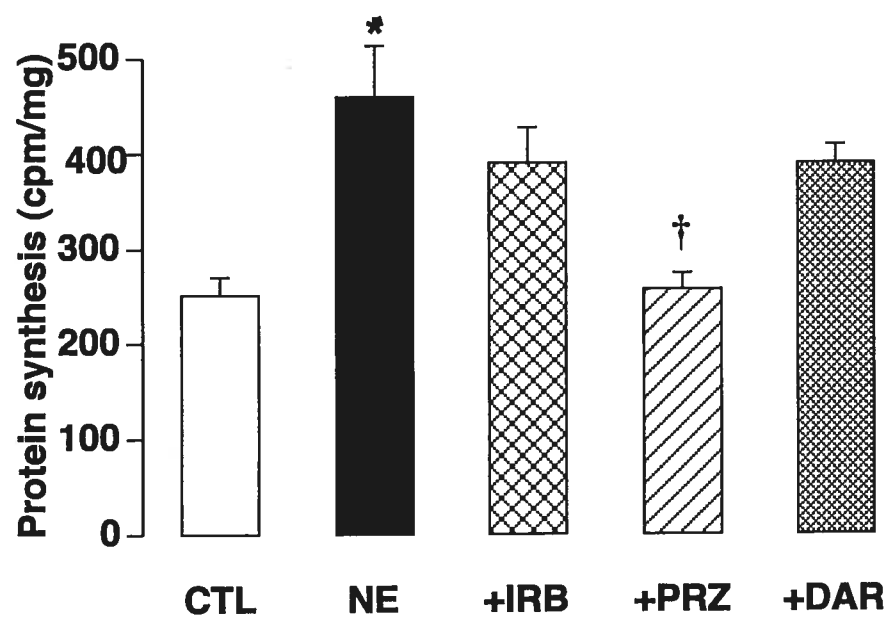
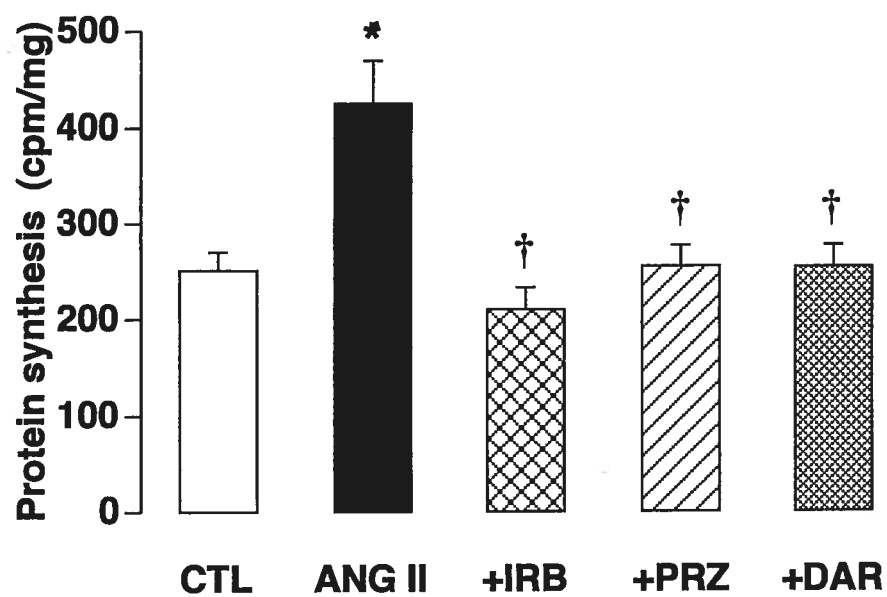
22. Simon G, Illyes G: Structural vascular changes in hypertension: Role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combinaison in rats. *Hypertension* 2001;37:255-260.
23. Herbert JM, Delisee C, Dol F, Schaeffer P, Cazaubon C, Nisato D, Chatelain P: Effect of sr 47436, a novel angiotensin II AT1 receptor antagonist, on human vascular smooth muscle cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 1994;251:143-150.
24. Costa M, Majewski H: Facilitation of noradrenaline release from sympathetic nerves through activation of ACTH receptors, β -adrenoceptors and angiotensin II receptors. *Br J Pharmacol* 1988;95:993-1001.
25. Imai T, Hirata Y, Emori T, al. e: Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992;19:753-757.
26. Hahn AW, Resink TJ, Scott BT, al. e: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: A novel autocrine function. *Cell Regul* 1990;1:649-659.
27. d'Uscio L, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997;29(2):435-441.
28. Wagner O, Christ G, Wojta J, al. e: Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:16066-16068.
29. deBlois D, Schwartz SM, van Kleef EM, Su JE, Griffin KA, Bidani AK, Daemen MJAP, Lombardi DM: Chronic alpha1-adrenoreceptor stimulation increases DNA synthesis in rat arterial wall. *Arterio, Thromb & Vasc Biol* 1996;16(9):1122-9.
30. Prasad MR, Jones RM, Kreutzer DL: Release of endothelin from cultured bovine endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:655-658.
31. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA: Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. *Circulation* 1996;93:2068-2079.
32. Taddei S, Viridis A, Abdel-Haq B, al. e: Indirect evidence for vascular uptake of circulating renin in hypertensive patients. *Hypertension* 1993;21:852-60.
33. van Kleef EM, Smits JF, De Mey JG, Cleutjens JP, Lombardi DM, Schwartz SM, Daemen MJ: Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ Res* 1992;70:1122-7.

34. Holycross BJ, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II stimulates increased protein synthesis, not increased DNA synthesis, in intact rat aortic segments, in vitro. *J Vasc Res* 1993;30:80-6.
35. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62:749-56.
36. Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T: Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmac* 1996;27:463-465.
37. Yang Z, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF: Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in humans arteries. *Circulation* 1990;82:188-195.
38. Wong-Dusting HK, La M, Rand MJ: Mechanism of the effects of endothelin on responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation. *Clin Exp Pharm Physiol* 1990;17:269-273.
39. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook N: Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97:508-514.
40. Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM: Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 1998;31:1331-7.

2.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES

Figure 1: Effect of exogenous angiotensin II (Ang II, top panel), norepinephrine (NE, middle panel) and endothelin-1 (ET-1, lower panel) on protein synthesis in small mesenteric arteries. The agonists were studied alone or in association with antagonists of AT₁ receptors (irbesartan, IRB), α -adrenoceptors (prazosin, PRZ) and ET_A receptors (darusentan, DAR). The same control rats served for Ang II and NE (n=8), while ET had different controls (n=6). * $P < 0.05$ as compared to control values and † $P < 0.05$ as compared to respective agonist (ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons)

Figure 2: Effect of exogenous angiotensin II (Ang II, top panel), norepinephrine (NE, middle panel) and endothelin-1 (ET-1, lower panel) on protein synthesis in the aorta. The agonists were studied alone or in association with antagonists of AT₁ receptors (irbesartan, IRB), α -adrenoceptors (prazosin, PRZ) and ET_A receptors (darusentan, DAR). The same control rats served for Ang II and NE (n=8), while ET had different controls (n=6). * $P < 0.05$ as compared to control values and † $P < 0.05$ as compared to respective agonist (ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons)



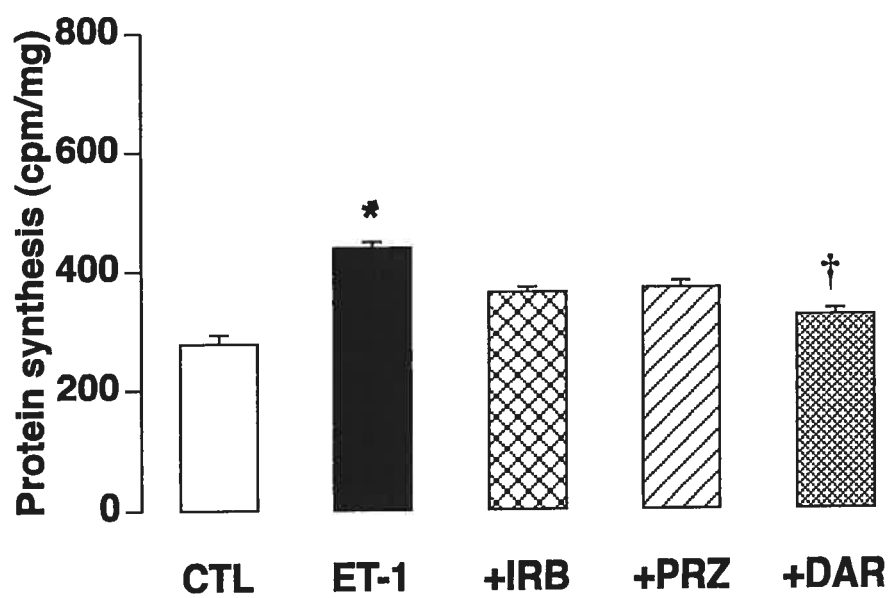
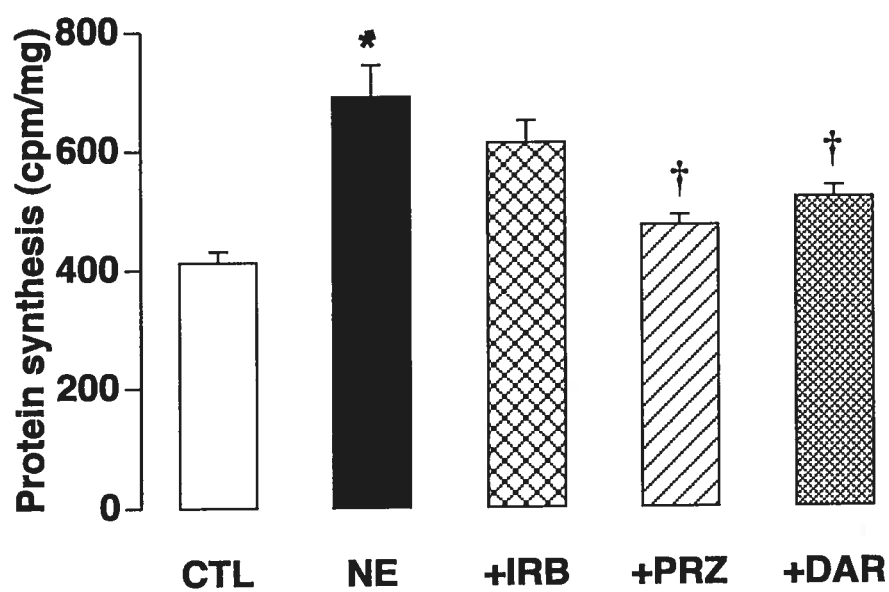
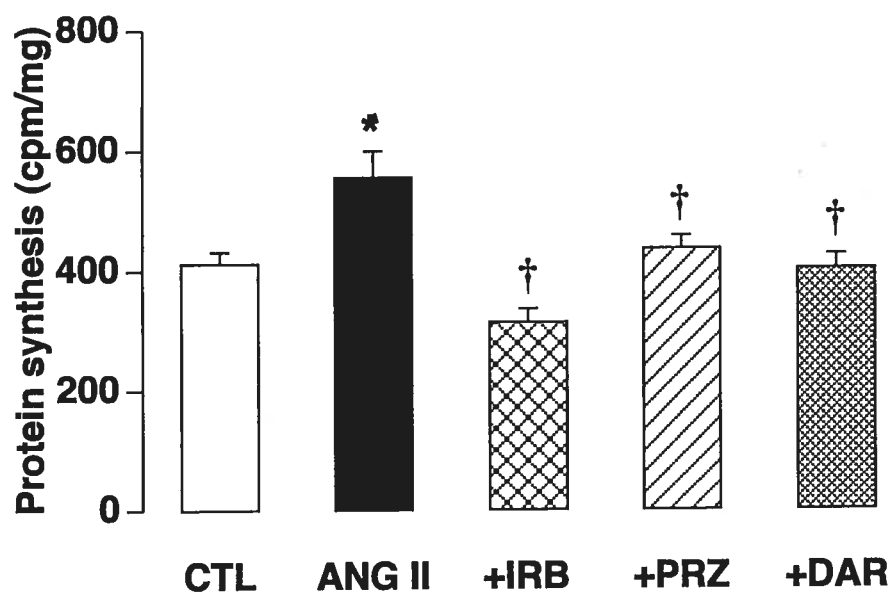


Table 1: Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	n	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (beat/min)
Control	14	86 ± 2	119 ± 2	97 ± 2	380 ± 6
Ang II	7	112 ± 6 *	138 ± 5 *	121 ± 6 *	383 ± 10
+ Irbesartan	4	77 ± 3 †	110 ± 4 †	88 ± 3 †	414 ± 7
+ Prazosin	6	96 ± 2 †	129 ± 3	107 ± 2	414 ± 13
+ Darusentan	10	104 ± 2	140 ± 13	116 ± 6	418 ± 11
NE	5	100 ± 7	133 ± 10	111 ± 8	420 ± 14 *
+ Irbesartan	8	74 ± 5 †	106 ± 3 †	85 ± 3 †	395 ± 4
+ Prazosin	5	105 ± 1	139 ± 3	116 ± 1	383 ± 3 †
+ Darusentan	6	86 ± 5	118 ± 2	97 ± 4	406 ± 5
ET-1	6	87 ± 5	126 ± 5	100 ± 5	383 ± 6
+ Irbesartan	6	77 ± 3	115 ± 2 †	90 ± 2	403 ± 7
+ Prazosin	6	80 ± 3	112 ± 2 †	90 ± 2	425 ± 12 †
+ Darusentan	6	85 ± 4	122 ± 2	98 ± 3	382 ± 8

Values are means ± SEM. n: number of rats per group; Control rats were pooled (NE and Ang II studies, n=8, plus ET study, n=6). DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure; MBP: mean blood pressure; HR: heart rate.

*p < 0,05 vs Control conditions, †p < 0,05 vs treatment with Ang II, NE or ET-1

Table 2. Plasma renin activity (PRA) and plasma concentrations of norepinephrine (NE), epinephrine (EPI) and endothelin-1 (ET-1), following *in vivo* stimulation with Ang II, NE and ET-1

	n	PRA (ng/mL/hr)	NE (ng/mL)	EPI (ng/mL)	ET-1 (pg/mL)
Control	5	8.8 ± 1.0	0.36 ± 0.10	0.10 ± 0.04	15.3 ± 2.7
Ang II	5	1.2 ± 0.6 *	0.60 ± 0.23	0.09 ± 0.02	12.7 ± 1.8
NE	5	8.5 ± 0.6	7.6 ± 1.8 *	0.15 ± 0.03	13.0 ± 0.9
ET-1	4	6.8 ± 1.2	0.37 ± 0.11	0.11 ± 0.03	25.4 ± 2.3 *

Values are means ± SEM. * p < 0,05 vs Control conditions

CHAPITRE 3 :

Position of Src tyrosine kinases in the interaction between angiotensin II and endothelin in in vivo vascular protein synthesis

Journal of Hypertension 2005;23:329-335

Original Scientific Communication

^aPierre Beaucage, ^bMarc Iglarz, ^aMarc Servant, ^bRhian M. Touyz and ^aPierre Moreau

^aFaculté de pharmacie, Université de Montréal and

^bInstitut de recherche clinique de Montréal (IRCM)

Short Title : Signaling for vascular protein synthesis *in vivo*

Financial support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). PB received a stipend from Canadian Hypertension Society/CIHR. MI is a fellow of the Foundation pour la Recherche Médicale (France). RMT, MS and PM are scholars from CIHR/Canadian Hypertension Society, FRSQ and CIHR, respectively.

Correspondence:

Pierre Moreau, Ph.D
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
PO Box 6128, Station Centre-ville
Montréal, Qc, Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 (3342)
Fax: (514) 343-2102
e-mail: [REDACTED]

3.1 ABSTRACT

Objectives: Endothelin is a necessary intermediate in the trophic action of angiotensin II during hypertension-induced resistance artery remodeling *in vivo*. Since Src tyrosine kinases can be activated by both agonists, we studied their role in the trophic action of angiotensin II, endothelin and their interaction in rat small mesenteric arteries.

Methods and results: Twenty-six hour infusion of high dose angiotensin II (400 ng/kg/min) or endothelin (5 pmol/kg/min) via osmotic pumps significantly enhanced vascular protein synthesis *in vivo*. When angiotensin II was used as the trophic stimulus, treatment with a Src tyrosine kinases inhibitor (PP2, 0.5 mg/kg, starting at 21 of the 26-hour stimulation) produced a significant attenuation of ERK 1 phosphorylation and of protein synthesis. However, PP2 administered at 21 hours or throughout the 26-hour infusion did not abrogate the elevation of protein synthesis induced by endothelin. Moreover, endothelin did not enhance the phosphorylation of ERK 1/2 in small mesenteric arteries. We confirmed that angiotensin II stimulated the expression of prepro-endothelin mRNA in small mesenteric arteries in a Src-dependent manner, as the response was inhibited by PP2. To support the specific inhibitory activity of PP2 on Src tyrosine kinases *in vivo*, angiotensin II-induced phosphorylation of cortactin, a Src-specific substrate, was inhibited by PP2.

Conclusion: Src tyrosine kinases represent an important signaling element in angiotensin II-induced endothelin production in small arteries *in vivo*. However, Src tyrosine kinases did not appear to contribute to the trophic signaling of endothelin, suggesting that they lie upstream of endothelin in the angiotensin II – endothelin – protein synthesis cascade.

Keywords: Angiotensin II - Endothelin-1 - vascular remodeling - Src tyrosine kinases – hypertrophy – ERK 1/2

3.2 INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) is an important stimulus of vascular hypertrophy, and such a response has been observed by several research groups using chronic *in vivo* administration of angiotensin II (Ang II) [1-4]. We have previously reported that Ang II-induced small artery hypertrophy was prevented by an endothelin receptor antagonist (ETRA)[3], suggesting an obligatory involvement of ET in the vascular trophic action of Ang II *in vivo*. We recently confirmed this finding using an acute *in vivo* model of vascular hypertrophy, in which 24 hours of Ang II stimulation produced a significant increase of small artery protein synthesis rate that was totally prevented by an ETRA [5]. The interaction between the RAS and the ET system is not limited to small artery hypertrophy, suggesting that the two systems cooperate locally to modulate several vascular responses [6].

Signal transduction pathways underlying Ang II-stimulated vascular hypertrophic remodeling are gaining in complexity [7]. Many studies report Ang II activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases, in vascular smooth muscle cells (VSMCs), suggesting a potential contribution of this signaling pathway to Ang II-induced vascular remodeling [8, 9]. Among MAP kinases, extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 were proposed to be essential in Ang II effects [10]. Mechanisms linking Ang II-receptor stimulation to ERK 1/2 activation are under intensive investigation. Among the candidates, it is proposed that non-receptor tyrosine kinases, such as the Src family, could play an important role in Ang II-stimulated VSMCs growth via ERK 1/2 [8, 11-13]. Indeed, Src tyrosines kinases are rapidly activated by Ang II stimulation[14]. Among Src kinases family, c-SRC appears to be the major isoform in the vascular wall[15], and seems to be involved in contraction [16], proliferation [17], growth [12] and cytoskeletal reorganization [18].

Interestingly, Ang II and ET share similar signaling pathways. Indeed, in both cardiomyocytes and VSMCs, ERK 1/2 signaling is involved regulating ET expression [19] and ET-induced cell growth [20, 21]. Moreover, recent studies suggest a role for non-receptor tyrosine kinase, such as Src, in ET-induced ERK1/2 activation [22] and ET-induced cardiomyocyte hypertrophy [23].

Considering the emerging role of Src family kinases in cellular processes induced by G-protein coupled receptors and the significant interaction between Ang II and ET *in vivo*, our first objective was to determine the involvement of Src tyrosine kinases in Ang II and ET-induced vascular protein synthesis, and thus their position in the interaction between the two systems. Secondly, we examined the phosphorylation of ERK 1/2 during Ang II and ET-induced protein synthesis in small mesenteric arteries *in vivo*. The selection of an *in vivo* model relies on the fact that little is known about the contribution of these signaling cascades in the pathological context of vascular remodeling. Moreover, the interaction between Ang II and ET is likely to be more significant *in vivo* where the vascular layers are intact, thus providing a better model to study signaling in that context.

3.3 MATERIALS AND METHODS

In total, 94 male Sprague-Dawley rats (300-325g) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). At least 2 days after arrival, animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) and two catheters (short PE10 segment welded to an extravascular PE50 segment) were inserted; one into the femoral artery and the other in the vein. The catheters were tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected with a tethering system. To study Ang II- and ET-induced vascular protein synthesis, osmotic pumps (model 1003D Alzet) releasing a constant dose of Ang II (400ng/kg/min[24], s.c., n=41), or ET-1 (5 pmol/kg/min[5], i.p., n=30) were implanted for twenty-six hours. We selected doses of Ang II and ET-1 based on pilot studies showing reproducible stimulation of vascular protein synthesis. Control rats were sham-operated (n=23), knowing that implanting saline-filled pumps did not modify protein synthesis. In subgroups of control, Ang II and ET-treated rats, PP2 (0.5 mg/kg i.v., a specific inhibitor of Src activity) was administered five hours before sacrifice of the animal. Dosage of PP2 was based on a pilot study in which its effect was minimal on blood pressure but maximal on Ang-stimulated vascular protein synthesis. The administration time of PP2 was selected in relation to leucine infusion. In rats used for the quantification of vascular protein synthesis, an i.v. L-(4,5-³H)leucine infusion was started 22 hours after the implantation of the osmotic pumps and was continued for a period of four hours at a rate of 12 μ Ci/hr. Thus, in order to evaluate the role of Src tyrosine kinases in Ang-or ET-induced vascular protein synthesis, we administered PP2 one hour before the leucine infusion (5 hours before sacrifice), as we previously reported for other drugs affecting signal transduction mechanisms [25]. In another subset of ET-treated rats, PP2 was administered at 8 hour intervals (0.5 mg/kg, i.v.), starting with the implantation of the osmotic pump. The same experiment was not done in the Ang II-treated rats, because PP2 inhibited protein synthesis when administered during the last 5 hours, making a longer inhibition period unnecessary. Hemodynamic parameters were measured by the intra-arterial catheter in awake rats during the last 4 hours of treatment, before sacrifice. All protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

3.3.1 Protein Synthesis Measurement

Following leucine infusion, animals were sacrificed by anesthesia and small mesenteric arteries (arteries branching from the superior mesenteric artery from ≈ 350 to less than $100\ \mu\text{m}$ of internal diameter) were harvested and frozen at -80°C . Vascular protein synthesis measurement was performed according to a protocol detailed in previous publications[5, 24, 25]. Results are expressed as cpm/mg of proteins and represent the protein synthesis rate over a period of 4 hours.

3.3.2 PreproET-1 mRNA levels in mesenteric arteries

Expression of ET-1 gene in mesenteric arteries was studied by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Reverse transcription was done in $20\ \mu\text{L}$ containing $1\ \mu\text{g}$ RNA, $1,5\ \mu\text{L}$ of $10\ \text{mmol/L}$ dNTP, $6\ \mu\text{L}$ of BRL 5x buffer, $0,6\ \mu\text{L}$ of oligo-(dT)₁₂₋₁₈ primer ($0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$), $1,5\ \mu\text{L}$ of $200\ \text{U}/\mu\text{L}$ M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL), $0,9\ \mu\text{L}$ of rRNasin (Rnase inhibitor; $40\ \text{U}/\mu\text{L}$), and $3\ \mu\text{L}$ of dithiothreitol ($0,1\ \text{mol/L}$) for 1 hour at 37°C . The reaction was stopped by heating at 95°C for 5 minutes. Two microliters of the resulting cDNA mixture was amplified using specific primers. For amplification of ET gene cDNA, sense 5'-TGC TCC TGC TCC TTG AT-3' and antisense 5'-CAC CAC GGG GCT CTG TAG TC-3' primers were used. For glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), sense 5'-TAT GAT GAC ATC AAG GTG-3' and antisense 5'-CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3' primers were used. PCR was conducted with an initial denaturing interval (95°C , 5 minutes) and then 30 sequence cycles for prepro-ET-1: 94°C (45 seconds), 60°C (30 seconds), and 72°C (30 seconds), for GAPDH: 94°C (45 seconds), 57°C (30 seconds), and 72°C (30 seconds). Amplification products were electrophoresed on 1% agarose gels containing ethidium bromide ($0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$). Bands corresponding to RT-PCR products were visualized by UV light and digitized using AlphaImager software. Band intensity was quantified using the ImageQuant (version 3.3, Molecular Dynamics) software.

3.3.3 Western blotting for ERK1/2

Proteins were extracted from small mesenteric arteries harvested as described above. The procedure for the western blotting is described in details elsewhere[26]. The antibodies used were a phospho-specific ERK 1/2 antibody (1:2000, Cell Signaling Technologies) and an anti-ERK 1/2 (1:1000, Cell Signaling Technologies). Immunoreactive bands were revealed and quantified by chemiluminescence with Chemiglow reagents and Chemi-Imager 5500 (CGW-80SK; Alpha Innotech Corporation).

3.3.4 Immunoprecipitation and immunoblot analysis of Cortactin

To analyze the state of cortactin phosphorylation, whole cell extract (200 μ g) prepared in NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A, 1% NP-40) were incubated for 3 h at 4°C with anti-cortactin (Upstate) antibody and the immune complexes were collected with protein A–Sepharose beads (Pharmacia Biotech). The beads were washed five times with NP-40 buffer, resuspended in denaturing sample buffer, and the eluted proteins were analyzed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibodies. Briefly, eluted proteins were subjected to electrophoresis on 7.5% acrylamide gels. The proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham, Inc.) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol. The membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20 for 1 h at 25 °C before incubation for 2 h at 25 °C with a monoclonal antiphosphotyrosine antibody mix consisting of 4G10 (0.33 μ g/ml, Upstate) and PY99 (0.2 μ g/ml, Santa Cruz) in TBST containing 3% BSA. After washing four times in TBST, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10000) in blocking solution. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence.

Membranes were stripped in a solution of 0.06 M Tris (pH 6.8), 2% SDS and 0.7% 2-mercaptoethanol, washed in TTBS, blocked with 5% non-fat dry milk, washed again with TTBS and blotted with an anti-cortactin mouse monoclonal antibody (2 μ g/mL, Upstate Technologies). Immunoreactive bands were quantified by chemiluminescence as described above.

3.3.5 Drugs and statistical analyses

Ang II was obtained from Sigma-Aldrich, while ET and PP2 were purchased from Calbiochem. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was done by a one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons, selected *a priori* and performed using Bonferroni's correction, were Ang II and ET groups compared to controls, and Ang + PP2 and ET + PP2 groups compared to their respective controls (Ang II or ET alone). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3.4 RESULTS

In mesenteric arteries, basal protein synthesis rate was 447 ± 18 cpm/mg, and did not change following PP2 treatment. However, Ang II infusion increased the rate of protein synthesis by 63%. In the first set of experiments, in which PP2 was administered five hours before harvesting the vessels, PP2 blunted the effect of Ang II and normalized protein synthesis (**Figure 1A**). Exogenous infusion of ET induced a significant elevation of protein synthesis (increase of 49 % from control values). However, administration of PP2 either acutely (5 hours) or throughout the 26 hours of ET administration did not prevent the effect of ET on protein synthesis rate (**Figure 1B**).

To confirm the interaction between Ang II and ET in our conditions, quantification of prepro-ET mRNA was performed in mesenteric arteries. The optical density ratio of prepro-ET/GAPDH was significantly augmented in the presence of Ang II infusion, as compared to control values. Treatment with PP2 significantly attenuated Ang II-induced mRNA expression of prepro-ET (**Figure 2**). To confirm that PP2 inhibited Src tyrosine kinases *in vivo* at the dose selected, we evaluated, as previously reported [27], tyrosine phosphorylation of a Src-specific substrate, cortactin, after its immunoprecipitation. As shown in **Figure 3**, Ang II stimulation produced a clear phosphorylation of cortactin, which was blunted by PP2. As a positive control, we used PDGF-stimulated VSMCs [28]

In mesenteric arteries, ERK 1 phosphorylation increased significantly after Ang II infusion, and this was abrogated by PP2 treatment (**Figure 4**). Interestingly, ERK 2 phosphorylation was not affected by Ang II infusion and by PP2. Infusion of ET did not significantly enhance ERK 1/2 phosphorylation. Surprisingly, PP2 administered with ET had a tendency to enhance ERK1/2 phosphorylation. Similar results, in presence of Ang II or ET stimulation, were obtained with 24 hour Src inhibition (data not shown).

Administration of the Src family inhibitor PP2 alone did not modify DBP, SBP, MBP and HR (**Table 1**). Following 26 hours of Ang II stimulation, DBP, SBP and MBP were augmented, as compared to the control group. Addition of PP2 to Ang II stimulation did

not modify pressure values significantly, although SBP tended to increase. The administration of exogenous ET-1 alone or with PP2 had no significant effect on pressure.

3.5 DISCUSSION

Intracellular signaling mechanisms underlying Ang II-dependent growth of VSMCs have been extensively explored recently [7]. ET-1 has been implicated to mediate some of the actions of Ang II, as demonstrated in *in vivo* and *in vitro* studies [6]. However, few studies have attempted to determine the position of key signaling elements relaying the interaction between Ang II and ET-1. The main finding of our work is that Src tyrosine kinases appear to play a major role in Ang II-stimulated protein synthesis, by allowing the stimulation of prepro-ET mRNA expression. Furthermore, this family of non-receptor tyrosine kinases was not involved in ET-induced vascular protein synthesis, confirming an upstream rather than a downstream position in relation to ET. Our findings also suggest that ERK1/2 may be positioned upstream of ET, but downstream of Src family kinases in the cascade leading to *in vivo* protein synthesis in small mesenteric arteries.

Although Src kinases have been reported to mediate some of the effects of Ang II *in vitro* [12-14, 27], we provide evidence that it also occurs *in vivo* in the trophic action of Ang II in small mesenteric arteries. Indeed, PP2 produced a striking inhibition of Ang II-induced vascular protein synthesis. We confirmed that at the dose selected, PP2 inhibited the phosphorylation of cortactin, which is a substrate of Src tyrosine kinases. Although this result does not prove that PP2 did not have non-specific effects to reduce protein synthesis, it is consistent with results obtained *in vitro* [27]. Moreover, the lack of effect of PP2 during ET-induced protein synthesis also suggests that PP2 did not have unspecific effects. It has been suggested that c-Src, a member of the Src tyrosine kinase family, is rapidly phosphorylated in the presence of Ang II stimulation in VSMC [14]. In fact, c-Src appears to be the major isoform of Src tyrosine kinases in the vasculature [15, 29]. However, identification of the family member mediating the effect of Ang II was

beyond the scope of our work. In addition to Src activation, we confirmed *in vivo* the results of several *in vitro* studies reporting that Ang II stimulation activates ERK in VSMC [9, 10, 12, 29]. However, only ERK 1 was significantly phosphorylated in our conditions. The significance of this result is not known. We also present evidence that Ang II-induced ERK-1 phosphorylation is src-dependent *in vivo*. These results are in line with previous observations in cultured VSMC, in which a similar effect of PP2 on Ang II-induced ERK 1/2 phosphorylation was reported [12]. Moreover, Ishida et al. demonstrated that overexpression of a dominant negative c-Src, significantly inhibited Ang II-stimulated ERK 1/2 phosphorylation in rat VSMC [29].

Previous publications have shown that prepro-ET expression is enhanced after Ang II stimulation in endothelial and VSMC [30, 31]. Our data demonstrating enhanced prepro-ET expression with Ang II *in vivo* is in line with these *in vitro* studies. Although in the present study vascular ET levels were not measured, other *in vivo* studies reported elevated vascular ET protein levels after chronic Ang II administration [3, 32]. The novel finding of the present study is the identification of signaling elements in the induction of prepro-ET expression *in vivo*. Underlying signaling pathways involved in ET production have been poorly investigated both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, thrombin-induced ET overexpression appears to be PKC-dependent [33], while Ang II-induced ET expression is mediated by the ERK 1/2 pathway [19]. Our data obtained under short term Ang II stimulation suggest that Src family of tyrosine kinases are involved in the local production of ET. Indeed, PP2 was able to blunt significantly Ang II-induced overexpression of prepro-ET in small mesenteric arteries. Our results also point to a potential involvement of ERK 1/2 in the same response, although more definite *in vivo* evidence is required.

In contrast to what was observed with Ang II, blockade of Src activity with PP2 either acutely or for the duration of ET administration did not inhibit ET-induced vascular protein synthesis *in vivo*. Thus, it appears that the Src kinases family is not a signaling element in the cascade leading to ET enhancement of protein synthesis. Our data are not necessarily in contradiction with previous studies that have attributed a role for Src

tyrosine kinases in the signaling of ET, as they were performed *in vitro* and in other cell types [22]. The doses used *in vitro* and in the present study may also explain some of the discrepancy. At 5 pmol/kg/min, plasma levels of ET double [5], whereas mesenteric arterial concentrations increase by approximately threefold (Dao et al, unpublished observation). These local concentrations are well within the pathophysiological range, where in higher concentrations (ten-fold) have been reported in human pulmonary hypertension [34]. Our stimulation may thus be smaller than that generally used *in vitro*, but nonetheless sufficient to induce significant vascular protein synthesis.

As with Ang II, Src tyrosine kinases were reported to act as an intermediate in the activation of ERK1 by ET in cultured fibroblasts [35]. In our experiments, ET did not increase the phosphorylation of ERK 1/2 in small mesenteric arteries. Although our results are in line with recent *in vitro* work demonstrating that ET increases total ERK 1/2 content, but not their activity after 120 hours of stimulation [36], they are at variance with other reports in cardiomyocytes [37], fibroblasts [35], myometrial cells [22] and VSMC [38]. Thus, the literature is conflicting about ET-induced ERK 1/2 activation. Brehm et al. have suggested that variable experimental conditions could explain this discrepancy [36]. Our study in more physiological conditions, using a dose producing a local concentration within the pathophysiological range, may help to clarify the situation, at least in vascular tissues.

3.5.1 Limitations and perspectives

Although the present study proposes signal transduction elements involved in the interaction between Ang II and ET on vascular protein synthesis in pathophysiological conditions, our experimental model has some limitations and our results should be interpreted within this context. For instance, it is technically difficult to construct accurate time-response curves, especially at very early time points. To circumvent this limitation, we designed two protocols: one evaluating the effect of PP2 throughout ET administration and the other one, similar to our previous work [25], administering PP2 during the last 5 hours of ET stimulation. Since the results were not different between

the two series of experiments, we concluded that Src kinases are not contributing to ET-induced protein synthesis either early or late in the process. This is in contrast to the effect of Ang II on Src kinases family, which appeared to be sustained *in vivo*, since late administration of PP2 (starting 21 hours after Ang II administration) blunted protein synthesis. Although the sustained effect of Ang II is at variance with studies in cultured conditions where c-Src activation lasted 10 minutes at most [12, 39], it must be emphasized that a bolus of Ang II is administered in cultured conditions, while we used a sustained infusion.

Another limitation of our model is the use of a relatively large dose of Ang II to stimulate vascular protein synthesis. Although smaller doses have been shown to produce vascular hypertrophy [4], we were unable to detect an elevation of protein synthesis with doses smaller than 400 ng/kg/min after 24 hours of administration. It is possible that smaller doses produce too subtle changes to be detected by our method or require a longer delay before stimulating protein synthesis. Nonetheless, since the trophic effect of 400 ng/kg/min in acute conditions and 200 ng/kg/min during chronic administration can be blocked by an ETRA, the acute model presented in this manuscript appears relevant to lower dose chronic model.

Working *in vivo* always brings the potential influence of hemodynamic factors on protein synthesis and cell signaling. It is well established that vascular hypertrophy of resistance arteries is partly mediated by pressure-independent mechanisms *in vivo* [1]. However, elevation of arterial pressure can potentially influence signal transduction pathways involved in protein synthesis [39, 40]. In our study, Ang II significantly elevated both arterial pressure and protein synthesis. Since PP2 decreased protein synthesis and ET expression, but did not reduce Ang II-induced increase of blood pressure, our results do not discriminate if Ang II directly or indirectly (through the elevation of arterial pressure) stimulates ET expression and protein synthesis. A smaller dose of Ang II (200 ng/kg/min, unpublished observation) significantly increased blood pressure but did not enhance protein synthesis, lending support to a direct action of Ang II at higher doses. Moreover, Ang II has been repeatedly shown to stimulate the

expression of ET *in vitro* [19]. Conversely, pressure elevation has been shown to enhance Src phosphorylation *in vitro*, although for less than 5 minutes [39]. Nonetheless, our results suggest that Src tyrosine kinases are not involved in acute blood pressure elevation induced by Ang II and that ET mediates a pressure-independent increase of protein synthesis.

3.6 CONCLUSION

In the present study we evaluated the position of Src tyrosine kinases in the interaction between Ang II and ET in the control of protein synthesis in small arteries, which is an early and robust marker of vascular hypertrophy [5]. Our results show that Src family of tyrosine kinases are positioned downstream of Ang II, but upstream of ET. Furthermore, our data demonstrates that ERK 1 is phosphorylated in a Src-dependent manner by Ang II, but not by ET, again suggesting that this signaling element lies upstream of ET. Thus, the results of the present study performed *in vivo* in a paradigm of vascular remodeling that is relevant to hypertension and its management, positions important signaling elements involved in the control of small artery hypertrophy. This work may help to devise appropriate therapeutic strategies aiming at providing vascular protection in addition to lowering of arterial pressure.

Acknowledgements

We thank Louise Ida Grondin for her excellent technical assistance.

3.7 REFERENCES

1. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, *et al.* Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991, **17**:626-35.
2. Dao HH, Martens FM, Lariviere R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, *et al.* Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens* 2001, **19**:1801-12.
3. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 1997, **96**:1593-7.
4. Simon G, Illyes G. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension* 2001, **37**:255-60.
5. Beaucage P, Yamaguchi N, Lariviere R, Moreau P. Heterogeneity in the acute control of vascular protein synthesis in vivo. *J Vasc Res* 2003, **40**:123-31.
6. Moreau P, Laplante MA, Beaucage P, de Champlain J, *Endothelin - Angiotensin interactions*, in *Handbook of Experimental Pharmacology: Angiotensin*, T. Unger and B. Schölkens, Editor. 2003, Springer-Verlag: p. [in press].
7. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000, **52**:639-72.
8. Haendeler J, Berk BC. Angiotensin II mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Regul Pept* 2000, **95**:1-7.
9. Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens* 1999, **17**:907-16.
10. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996, **271**:16047-52.
11. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997, **29**:366-73.
12. Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth

signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 2001, **38**:56-64.

13. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997, **80**:607-16.

14. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995, **77**:1053-9.

15. Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999, **77**:606-17.

16. Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, *et al.* Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2001, **19**:441-9.

17. Schwartzberg PL. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 1998, **17**:1463-8.

18. Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahashi M, Berk BC. Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest* 1999, **103**:789-97.

19. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, *et al.* Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004, **61**:159-68.

20. Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 1998, **76**:725-46.

21. Douglas SA, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res* 1997, **34**:152-64.

22. Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**:C251-60.

23. Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1998, **273**:35185-93.

24. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, *et al.* Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002, **39**:16-21.

25. Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**:C446-55.
26. Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999, **84**:505-15.
27. Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002, **39**:479-85.
28. Craig AWB, Zirngibl R, Williams K, Cole LA, Greer PA. Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol and Cel Biol* 2001, **21**(2):603-613.
29. Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998, **82**:7-12.
30. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, **332**:411-5.
31. Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, **271**:429-37.
32. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ET_A-receptors for endothelin regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, **238**:861-865.
33. Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, *et al.* Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992, **44**:2409-11.
34. Giaid A, Yanagisawa M, Langeden D, Michel RP, Levy R, Shennib H, *et al.* Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Eng J Med* 1993, **328**:1732-9.

35. Bisotto S, Fixman ED. Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by the type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. *Biochem J* 2001, **360**:77-85.
36. Brehm BR, Klaussner M, Wolf SC. Chronic elevated endothelin-1 concentrations regulate mitogen-activated protein kinases ERK 1 and ERK 2 in vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond)* 2002, **103 Suppl 48**:137S-140S.
37. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, *et al.* Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002, **34**:139-50.
38. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999, **140**:4659-68.
39. Rice DC, Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Src autophosphorylation is an early event in pressure-mediated signaling pathways in isolated resistance arteries. *Hypertension* 2002, **39**:502-7.
40. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996, **97**:508-14.

3.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES

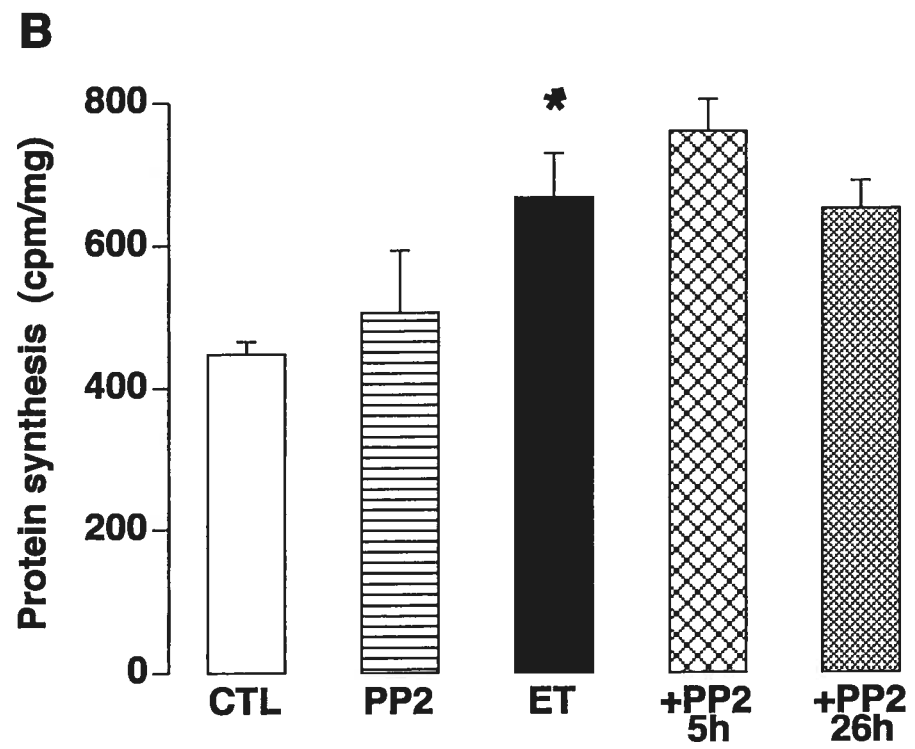
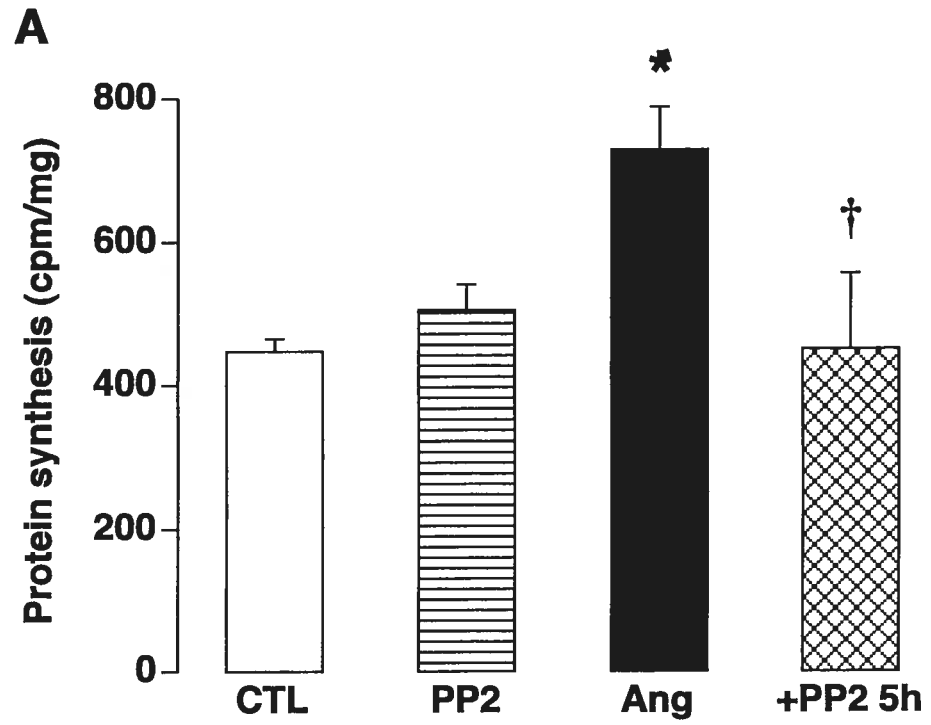
Figure 1: **A)** Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from control rats (CTL), rats treated for 26 hours with angiotensin II (Ang) alone, for 5 hours with PP2 alone, or with a combination of both treatments (+PP2 5h). **B)** Similar measurements in rats treated for 26 hours with endothelin (ET) alone or with PP2 administered during the last 5 hours of its infusion (+PP2 5h), or throughout its infusion (+PP2 26h). * $P < 0.05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

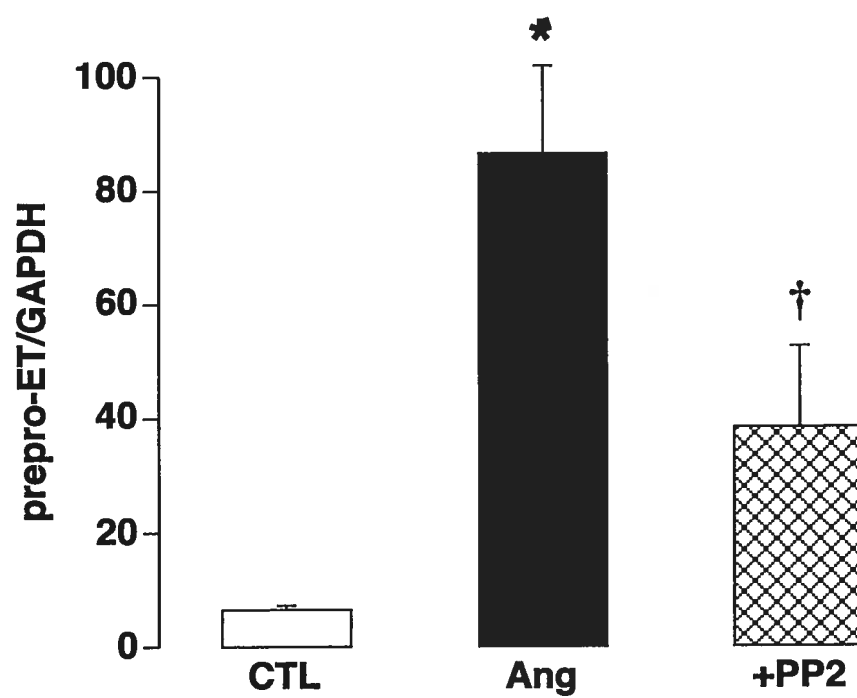
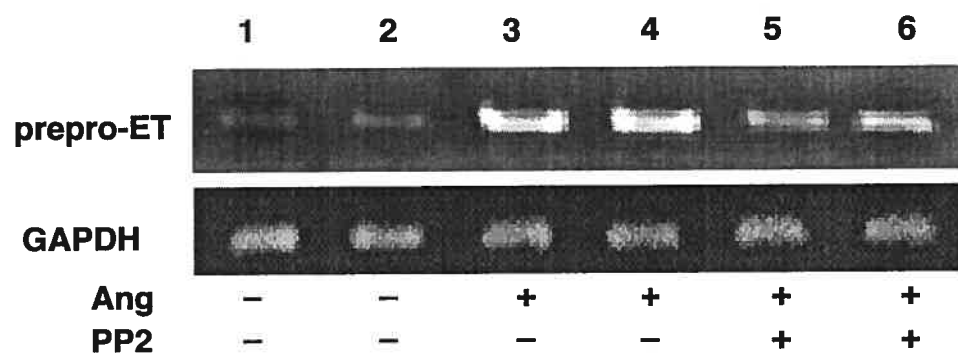
Figure 2: Reverse transcription PCR of prepro-ET and GAPDH in small mesenteric arteries from control (lanes 1 and 2), angiotensin II-treated (Ang, lanes 3 and 4) and Ang plus PP2-treated rats (lanes 5 and 6). The chart represents the ratio of prepro-ET on GAPDH. See legend of figure 1 for duration of treatments. * $P < 0.05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to Ang or ET. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

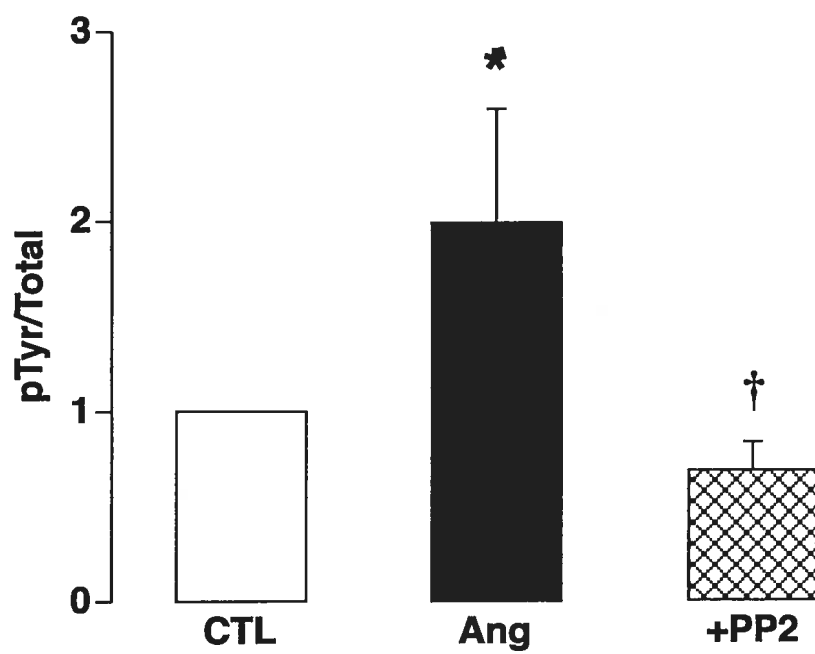
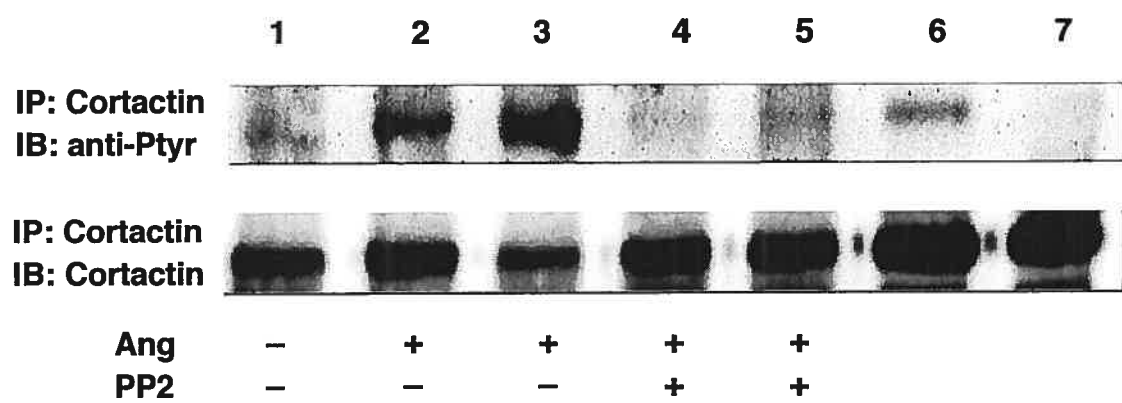
Figure 3: Phospho-tyrosine immunoblot after an immunoprecipitation with a cortactin antibody in mesenteric arteries from control (lane 1), angiotensin II-treated (Ang, lanes 2 and 3) and Ang + PP2-treated rats (5 hours of inhibition, lanes 4 and 5). The next lanes represent control experiments using unstimulated VSMC (lane 7) or VSMC stimulated with 50 ng/ml PDGF-BB for 10 minutes (lane 6). The membrane was stripped and reblotted with an anti-cortactin antibody to show the total amount of cortactin in the samples after immunoprecipitation (second blot). The chart represents the relative ratio of phosphorylated cortactin on total cortactin, as compared to the control ratio. * $P < 0.05$ as compared to the CTL value of 1 (one sample analysis), † $P < 0.05$ as compared to Ang alone (unpaired t test).

Figure 4: Representative pictures of western blot analysis of ERK 1/2 with a phosphospecific antibody or a anti-ERK 1/2 antibody (total protein). Lanes 1 to 5 correspond to the labels underneath the bar chart depicting the average of 4 experiments (ERK 1: hollow bars; ERK2: dark bars). Ang: angiotensin II administered for 26 hours;

ET: endothelin-1 administered for 26 hours; PP2: administered as a bolus 5 hours before the end of Ang or ET infusion. Similar data were obtained with PP2 administered throughout Ang II and ET administration (not shown). * $P < 0.05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.







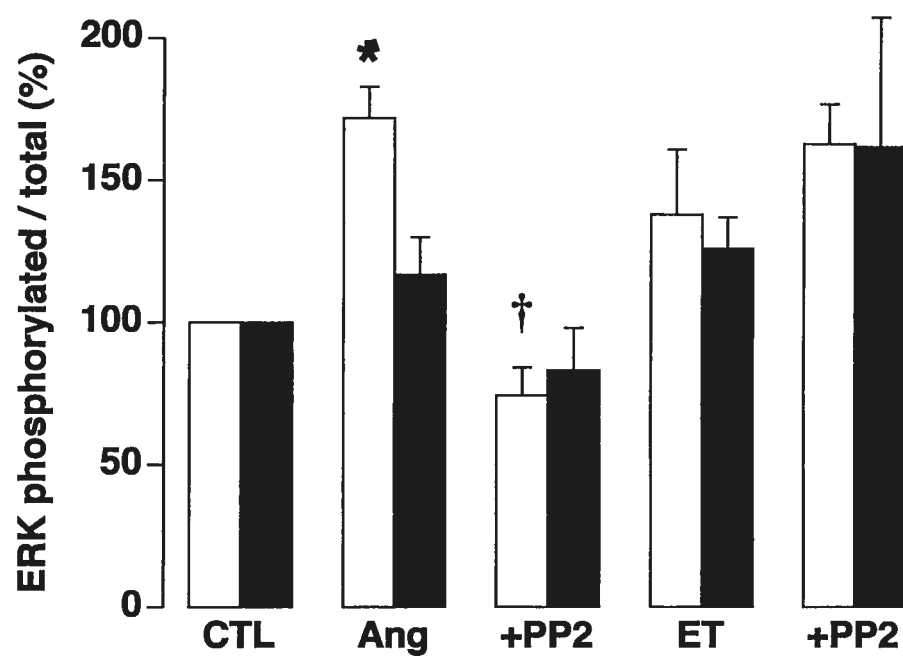
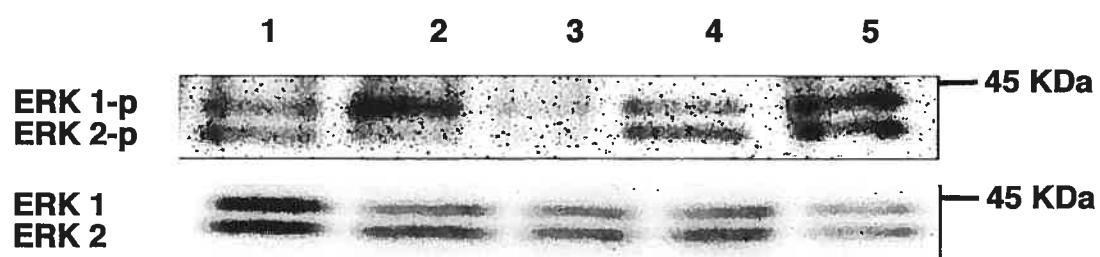


Table 1: Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	n	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (mmHg)
Control	23	87 ± 2	119 ± 2	97 ± 1	360 ± 13
PP2	2	86 ± 4	124 ± 5	99 ± 3	350 ± 12
Ang II	7	112 ± 6 *	138 ± 5 *	121 ± 5 *	383 ± 10
+PP2	4	109 ± 7	159 ± 11	126 ± 9	350 ± 32
ET-1	6	84 ± 3	121 ± 2	96 ± 2	339 ± 6
+PP2	6	81 ± 3	119 ± 3	94 ± 3	339 ± 7

Values are means ± SEM. n: number of rats per group in which hemodynamic measurements were made; control rats were pooled (Ang II n=12, plus ET study, n=11). DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure; MBP: mean blood pressure; HR: heart rate. * $P < 0.05$ as compared to CTL. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

CHAPITRE 4 :

EGF Receptor Transactivation in Angiotensin II and Endothelin Control of Vascular Protein Synthesis in vivo

Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2004; 43(suppl 1): S20-S23
(voir Annexe)

Pierre Beaucage, M.Sc. and Pierre Moreau, Ph.D.

Faculté de pharmacie, Université de Montréal
Montréal, Qc, Canada

Short Title : EGFR transactivation in vascular protein synthesis

Source of support: This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). PB receives a stipend from the Canadian Hypertension Society/CIHR and PM is a CIHR scholar.

Address correspondence to :

Pierre Moreau, Ph.D
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
PO Box 6128, Station Centre-ville
Montréal, Qc, Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 (3342)
Fax: (514) 343-2102
e-mail: [REDACTED]

4.1 ABSTRACT

Endothelin represents a necessary intermediate of angiotensin II-induced resistance artery remodeling in hypertension. Recent data suggest that epidermal growth factor receptors (EGFR) are rapidly transactivated by angiotensin II stimulation to mediate its growth promoting effects. Since endothelin also transactivates EGFR *in vitro*, we studied the contribution of EGFR transactivation in the *in vivo* trophic actions of the upstream effector angiotensin II, and its downstream mediator endothelin in rat mesenteric arteries. Twenty-six hour infusion of angiotensin II (400 ng/kg/min) or endothelin (5 pmol/kg/min) via osmotic pumps significantly enhanced vascular protein synthesis. With angiotensin II, treatment with the inhibitor of EGFR transactivation (AG1478, 0.5 mg/kg) produced a significant attenuation ($p < 0.05$) of protein synthesis. In contrast, AG1478 did not abrogate the elevation of protein synthesis induced by endothelin. In conclusion, angiotensin II-induced EGFR transactivation seems to be involved in the recruitment of endothelin in the cascade leading to vascular protein synthesis, rather than in the effect of ET on small artery remodeling.

Keywords: Angiotensin II, endothelin, epidermal growth factor, hypertrophy, vascular remodeling, hypertension

4.2 INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) represents an important modulator of vascular remodeling, as exemplified *in vivo*, in chronic and acute models of angiotensin II (Ang II) administration [1-4]. In most instances, Ang II-induced remodeling was prevented by endothelin (ET) receptor antagonists (ETRA), suggesting that the RAS recruits ET to produce the final remodeling effect [5, 6]. This necessary involvement of ET in the trophic action of Ang II was recently confirmed using short-term *in vivo* evaluation of protein synthesis [4].

Cell signaling used by Ang II to transmit information from the cell surface to the internal cellular environment is gaining in complexity [7]. Recent advances suggest that Ang II-induced epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation is an early signaling component of Ang II-induced cellular growth *in vitro* [8] and *in vivo* [9]. Interestingly, ET and Ang II share similar signaling pathways, including EGFR transactivation [10]. Considering the growing importance of EGFR transactivation in cell signaling originating from G protein-coupled receptors, our aim was to determine the involvement of EGFR transactivation in the signaling of ET and Ang II (and their interaction) leading to vascular protein synthesis *in vivo*.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Surgical procedures and treatments

Sprague-Dawley rats (300-325g) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). Animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) and polyethylene catheters were inserted into a femoral artery and vein. The tubing was then tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected by a tethering system.

To study the underlying mechanisms involved in Ang II- and ET-induced vascular protein synthesis, mini osmotic pump (model 1003D Alzet) releasing a constant dose of Ang II (400ng/kg/min, s.c. [11] or ET (5 pmol/kg/min, i.p. [4]) for twenty-six hours were implanted in the animal at the time of catheterization. Rats were allowed to recover unrestrained until drug treatment and had free access to food and water. In subgroups, treatment with AG1478 (0,5 mg/kg), a specific EGFR kinase inhibitor, was administered as an intravenous bolus five hours before sacrifice of the animal (21 hours after starting Ang II and ET infusion). One hour later, in rats used for quantification of protein synthesis, an i.v. L-(4,5-3H)leucine infusion was started and lasted for a period of four hours (12 μ Ci/hr). Rats were then sacrificed by anesthesia and small mesenteric arteries extending from, but excluding, the superior mesenteric artery were harvested and frozen at -80°C. All hemodynamic parameters were measured during the last 5 hours and are presented in table 1. The Animal Care and Use Committee of Université de Montréal approved all protocols.

4.3.2 Protein Synthesis Measurement

Quantification of protein synthesis rate was performed according to a protocol described in previous publications [4, 9, 11]. Results are expressed as cpm/mg of proteins and represent the vascular protein synthesis rate over a period of 4 hours.

4.3.3 Drugs and Statistical Analysis

Ang II was obtained from Sigma-Aldrich, while ET and AG 1478 were purchased from Calbiochem. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were selected a priori and performed using Bonferroni's correction: the Ang II, ET and AG1478 groups were compared to the control group, while the Ang +AG1478 group was compared to Ang, and ET +AG1478 to ET. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

4.4 RESULTS

Administration of AG1478 alone did not modified values of diastolic blood pressure (DBP), systolic BP (SBP), mean BP (MBP) and HR (**TABLE 1**). Following 26 hours of Ang II stimulation, DBP, SBP and MBP were augmented, compared to the control group. In the Ang +AG1478 group, the hemodynamic values were intermediate between control and Ang II (n.s. vs Ang II). Exogenous infusion of ET-1 did not produce significant effects on hemodynamic parameters and AG1478 administered on top of ET had no effect.

In mesenteric arteries, basal protein synthesis was 240 ± 27 cpm/mg, and did not change significantly following AG1478 treatment (**Fig 1A**). However, Ang II infusion augmented by 107% the rate of protein synthesis. This effect was blunted by AG1478 treatment administered 5 hours before harvesting the tissues (**Fig 1A**). Exogenous infusion of ET induced a significant elevation of protein synthesis (137 %) above control values. In contrast to the Ang II response, AG1478 did not inhibit the effect of ET on the protein synthesis rate (**Figure 1B**).

4.5 DISCUSSION

Intracellular signaling pathways underlying Ang II- and ET-dependent processes related to growth of VSMCs have been explored extensively in *in vitro* conditions [7]. Transactivation of EGFR has been proposed as an intermediate for the activation of signaling pathways involved in the control of cellular growth. The main finding of our *in vivo* work in small mesenteric arteries is that only Ang II, but not ET, rely on EGFR transactivation to stimulate vascular protein synthesis.

In line with previous work done in our laboratory [9] and with *in vitro* work as well [8, 12], we confirmed that EGFR transactivation is essential in Ang II-induced vascular protein synthesis in resistance arteries. Indeed, AG1478 blunted significantly Ang II-stimulated vascular protein synthesis. Our observations are in line with the evidences supporting a central role of EGFR transactivation in Ang II-induced migration and growth of VSMCs [13]. Moreover, transactivation of EGFR is required for Ang II-activation of growth signaling such as ERK 1/2 and PI3 kinase in VSMC [8, 12]. EGFR transactivation has also been suggested to either serve as a scaffolding for preactivated Src tyrosine kinases [12], or to be activated by Src [8]. Interestingly, we have preliminary data to suggest that Src family of tyrosine kinases are also involved in Ang II-induced, but not ET-induced, protein synthesis, suggesting cooperation between the two kinases [14].

Elevation of arterial pressure is known to activate signal transduction mechanisms which lead to protein synthesis and later to vascular remodeling [15, 16]. Although we observed an elevation of arterial pressure with Ang II, we have previously shown that the enhancement of protein synthesis rate by Ang II is pressure-independent, as it can be inhibited by an ETRA which did not reduce the pressure [4]. In addition, ET stimulation clearly had a pressure independent increase in protein synthesis, suggesting that pressure elevation is not required to enhance vascular protein synthesis.

Considering the ubiquitous role of ET for the progression of vascular hypertrophic remodeling [6], it is quite surprising that few publications have studied vascular

remodeling following direct ET stimulation. After demonstrating that ET stimulates small artery protein synthesis *in vivo* [4], we are aiming at identifying its signaling pathways. In the present work, we were unable to demonstrate that EGFR transactivation is a signaling event involved in ET-stimulated protein synthesis. This is in contrast to what we observed when Ang II is used as the agonist, and also in contradiction to studies in cultured VSMC showing a role for EGFR transactivation in ET-induced protein synthesis [17]. The discrepancy could be explained by the approach and we believe that the *in vivo* approach used in the present experiment is closer to pathophysiological conditions than previous *in vitro* work, by providing a better integration of cellular and local mediator interactions.

Although we have yet to provide definite proof, our results suggest that EGFR transactivation lies in between Ang II and ET to relay the trophic information. Indeed, considering that Ang II requires ET to stimulate protein synthesis [4] and that only Ang II requires EGFR transactivation, the transactivation step is likely to lead to the overexpression of ET. We have recently demonstrated that it is exactly the case for Src family kinases [14]. Indeed, blocking this signaling step reduces Ang II-induced prepro-ET expression and protein synthesis, while it is without effect on ET-induced protein synthesis.

4.6 CONCLUSION

In the present study we evaluated the contribution of EGFR transactivation in Ang II- and ET-induced protein synthesis. Taken together with our previous work demonstrating an interaction between Ang II and ET, the present results suggest that EGF receptor transactivation is upstream to ET in cascade leading to protein synthesis. Thus, in ET-mediated small artery remodeling *in vivo*, EGFR transactivation does not play a significant role, although it may relay the signal from the renin angiotensin system to the ET system.

Acknowledgements

The authors acknowledge the excellent technical contribution of Louise Ida Grondin.

4.7 REFERENCES

1. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-35.
2. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 1997;96:1593-7.
3. Simon G, Illyes G. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension* 2001;37:255-60.
4. Beaucage P, Yamaguchi N, Lariviere R, et al. Heterogeneity in the acute control of vascular protein synthesis in vivo. *J Vasc Res* 2003;40:123-31.
5. Moreau P, Laplante M, Beaucage P, et al., *Angiotensin - Endothelin interactions*. In: *Handbook of Experimental Pharmacology: Angiotensin*, Section 1: Gene aspect. Unger T, Schölkens BA (eds). Berlin: Springer-Verlag; 2004, 163/I: 149-170
6. Moreau P, Schiffrin EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:511-521.
7. Touyz R, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000;52:639-72.
8. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney Int* 2000;58:549-58.
9. Voisin L, Foisy S, Giasson E, et al. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C446-55.
10. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, et al. Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:139-50.
11. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, et al. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002;39:16-21.

12. Touyz RM, Wu XH, He G, et al. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002;39:479-85.
13. Saito S, Frank GD, Motley ED, et al. Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;280:1116-1119.
14. Beaucage P, Touyz R, Moreau P. In vivo investigation of the role of Src in the vascular trophic action of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 2002;40:392.
15. Rice DC, Dobrian AD, Schriver SD, et al. Src autophosphorylation is an early event in pressure-mediated signaling pathways in isolated resistance arteries. *Hypertension* 2002;39:502-7.
16. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, et al. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996;97:508-14.
17. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, et al. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999;140:4659-4668.

4.8 FIGURE LEGENDS, FIGURES AND TABLES

Figure 1: A) Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from control rats (CTL), rats treated with AG1478, rats treated for 26 hours with angiotensin II (Ang) alone or with AG1478.

Figure 1: B) Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from control rats, rats treated for 26 hours with endothelin (ET) or with AG1478.

* $P < 0,05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

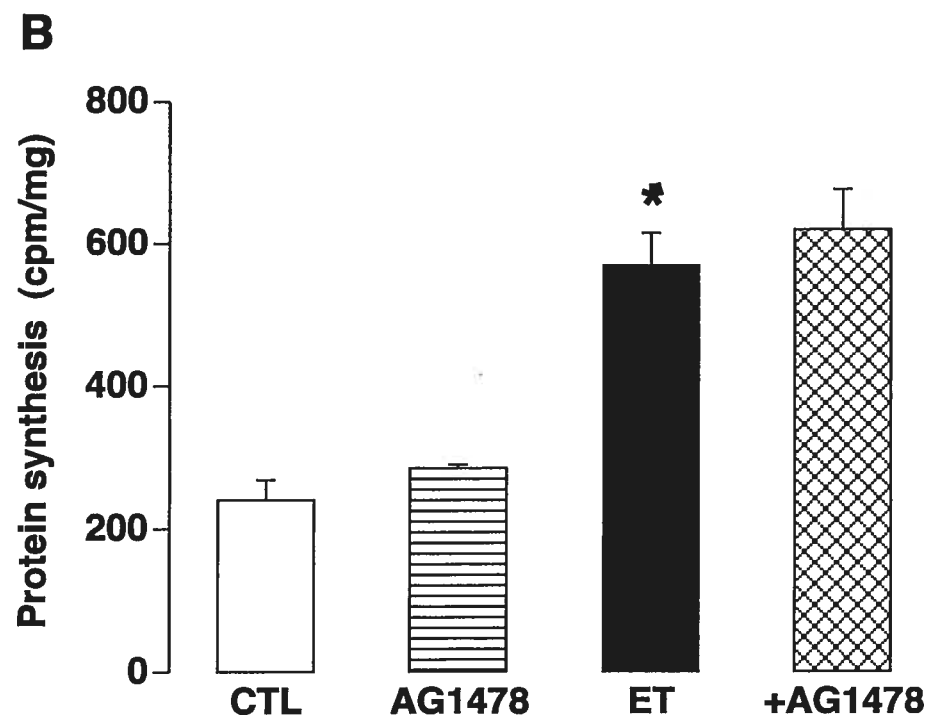
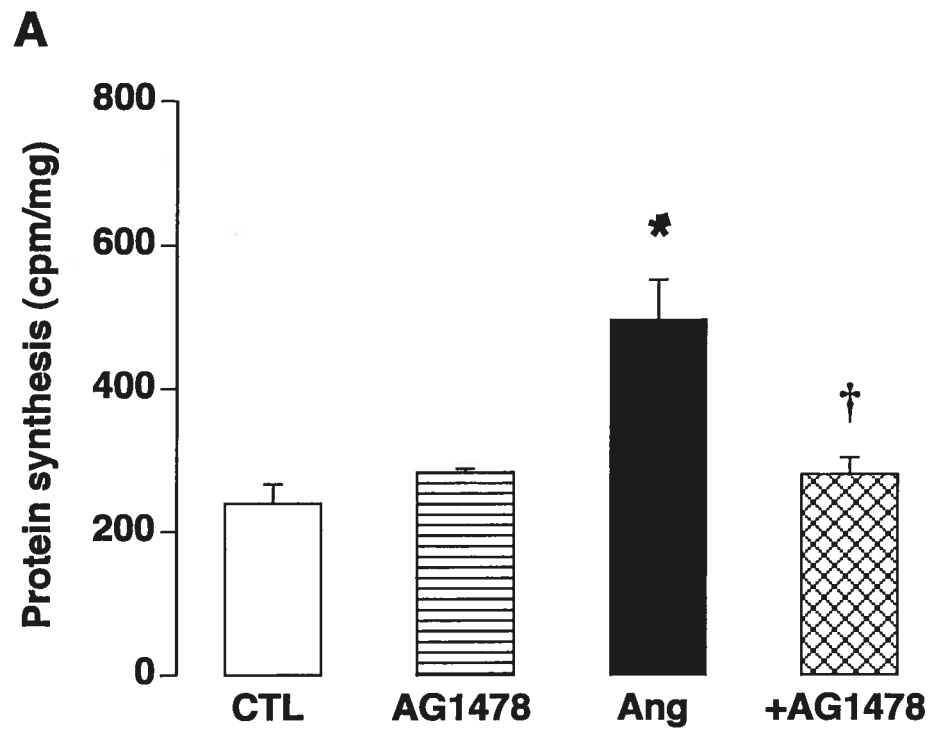


Table 1: Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	n	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (mmHg)
Control	14	87 ± 2	119 ± 2	97 ± 1	360 ± 13
AG 1478	3	89 ± 7	126 ± 5	101 ± 3	382 ± 6
Ang II	7	112 ± 6 *	138 ± 5 *	121 ± 5 *	383 ± 10
+ AG1478	3	96 ± 2 [†]	129 ± 5	107 ± 3	382 ± 6
ET-1	6	84 ± 3	121 ± 2	96 ± 2	339 ± 6
+ AG1478	6	78 ± 6	122 ± 9	93 ± 6	372 ± 14

Values are means ± SEM. n: number of rats per group in which hemodynamic measurements were made; control rats were pooled (Ang II n=7, plus ET study, n=7). DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure; MBP: mean blood pressure; HR: heart rate. * $P < 0.05$ as compared to CTL. [†] $P < 0.05$ as compared to Ang II. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS & CONTRIBUTIONS ORIGINALES

5.1.1 Résumé des résultats

Dans le cadre de cette thèse, nous avons émis, dans un premier temps, l'hypothèse que l'ET possède un rôle central à l'action du SRA et à celle du SNS dans le contrôle de l'hypertrophie vasculaire. De plus, nous avons suggéré l'hypothèse que ces interactions impliquées dans l'hypertrophie vasculaire n'étaient pas les mêmes entre les artères de conductance et de résistance. Afin de confirmer ces hypothèses, une quantification du taux de synthèse protéique vasculaire a été effectuée et a permis d'évaluer, dans une phase précoce du remodelage vasculaire hypertrophique, ces interactions et les différences qui prennent place entre les deux types de territoires artériels. Dans les artères de résistance, une cascade linéaire semble s'établir. Le SRA constitue le système le plus en amont. Le SNS est par la suite activé et finalement l'ET représente le facteur le plus en aval dans cette cascade d'interactions impliquées dans le contrôle de la synthèse protéique vasculaire (Figure 1.12). Par ailleurs, dans les artères de conductance, le SNS local constitue le facteur le plus en aval dans le contrôle de la synthèse protéique vasculaire. Ainsi, autant le SRA et l'ET se retrouvent en amont et activent directement le SNS afin d'induire l'hypertrophie de ces artères.

Dans un deuxième temps, nous avons émis l'hypothèse que les tyrosines kinases de la famille Src constituaient, *in vivo*, des éléments essentiels de signalisation cellulaire dans la production de l'ET et dans l'effet de l'ET dans la cascade Ang II – ET – synthèse protéique vasculaire des artères de résistance. Les résultats obtenus au cours de ce deuxième projet démontrent que les tyrosines kinases de la famille Src constituent des éléments importants de la signalisation cellulaire de l'Ang II, *in vivo*, associés à l'augmentation de la synthèse protéique des artères de résistance. Rapidement les

tyrosines kinases Src sont activées par l'Ang II et permettent la production de l'ET dans les artères de résistance (Figure 1.12). De même, l'activation de la voie ERK semble contribuer en amont de l'ET. Toutefois, ces tyrosines kinases non-réceptorielles et la voie ERK ne représentent pas des éléments de signalisation cellulaire nécessaires à l'ET, *in vivo*, afin d'induire l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire.

Dans un troisième temps, nous avons émis l'hypothèse que la transactivation du récepteur de l'EGF contribue, *in vivo*, en aval de l'ET, à l'augmentation de la synthèse protéique des artères de résistance. Les résultats obtenus à l'intérieur de ce troisième projet démontrent une contribution de la transactivation du récepteur de l'EGF en amont de l'ET dans l'interaction Ang II – ET – synthèse protéique (Figure 1.12). Toutefois, la transactivation du récepteur de l'EGF ne semble pas être un élément de la signalisation cellulaire en aval de l'ET dans l'induction de la synthèse protéique vasculaire.

5.1.2 Contributions originales

Les artères de résistance et de conductance subissent un remodelage vasculaire hypertrophique qui impliquent des mécanismes cellulaires distincts. À la suite d'une stimulation à l'Ang II et à la NE, un remodelage hypertrophique correspondant à une croissance (growth) cellulaire s'établit dans les artères de résistance. Cependant, ces mêmes influences neurohumorales induisent un remodelage hypertrophique correspondant à une prolifération (proliferation) dans les artères de conductance. Ainsi, les résultats de cette thèse ont donc permis d'établir que la NE et l'ET constituent les facteurs centraux dans le contrôle de la synthèse protéique vasculaire des artères de conductance et de résistance respectivement. Ces résultats obtenus tôt dans le processus de remodelage vasculaire hypertrophique peuvent donc donner une explication quant à l'hétérogénéité des mécanismes cellulaires, entre les artères de conductance et de résistance.

En raison de l'importance fonctionnelle des artères de résistance dans le développement de l'hypertension artérielle, nous avons voulu élucider certains éléments de la

signalisation cellulaire qui contribuent, *in vivo*, à l'interaction Ang II – ET - synthèse protéique dans ce type d'artères. Contrairement aux études de signalisation cellulaires qui sont généralement effectuées dans un contexte *in vitro*, l'originalité de notre démarche expérimentale a établi, *in vivo*, la contribution de certains éléments de signalisation courants, tel les tyrosines kinases de la famille Src, le récepteur de l'EGF et ERK1 afin d'induire la synthèse de l'ET dans les artères de résistance. Les deux derniers projets de cette thèse ont permis pour la première fois de mieux positionner, *in vivo*, certains éléments de signalisation impliqués dans l'interaction Ang – ET - synthèse protéique, dans les artères de résistance. Sachant que l'ET possède un rôle central dans l'initiation de l'hypertrophie de ces artères, la poursuite, *in vivo*, de l'étude de la signalisation cellulaire en aval de l'ET assurerait l'identification de cibles pharmacologiques qui permettrait de renverser le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance suite à son établissement.

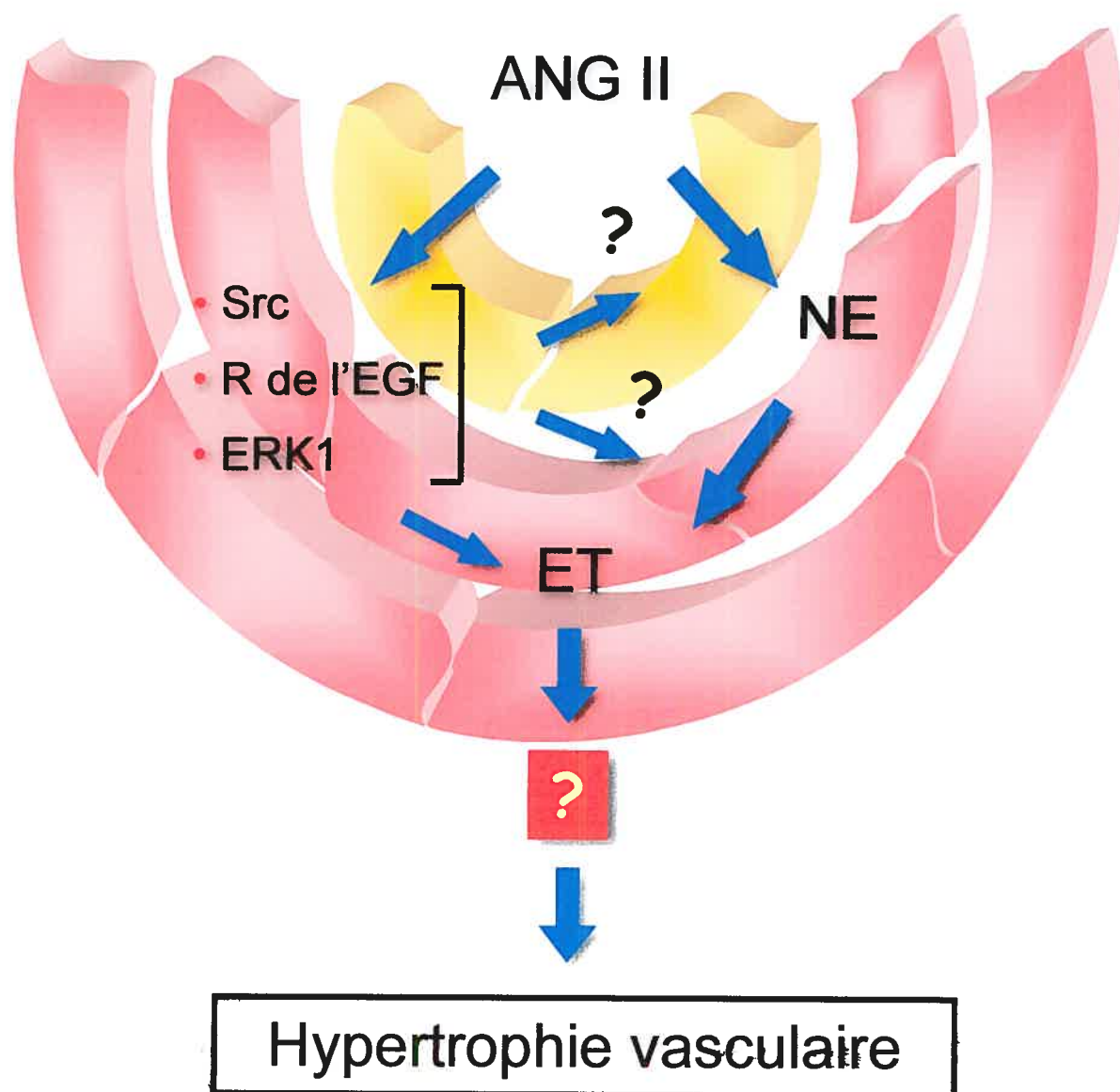


Figure 1.13 Interactions neurohumorales et signalisations impliquées dans le remodelage hypertrophique: Rôle central de l'endothéline

5.2 MODÈLE EXPÉRIMENTAL

5.2.1 Sélection du modèle *in vivo*

Les études *in vitro* utilisant une stimulation neurohumorale (Ang II, NE, ET) ont permis de déterminer le rôle de ces influences à l'égard de la croissance de plusieurs types cellulaires, telles les CMLVs^{202, 377, 430}. De plus, la simplicité de l'approche *in vitro* a favorisé la découverte, au-delà de l'activation réceptorielle, des sentiers de signalisation intra-cellulaire associés à la réponse hypertrophique et hyperplasique⁹¹. Ainsi, l'engouement pour les études *in vitro* ont permis des percées importantes à la compréhension des mécanismes intra-cellulaires⁴⁶¹. Toutefois, les conditions expérimentales souvent associées à ce type d'étude peuvent impliquer un changement du phénotype cellulaire⁵⁰⁶. De plus, les doses des agents pharmacologiques administrés sont généralement supra-physiologiques⁵⁰⁶, Mais surtout, la réduction à un seul type cellulaire empêche d'évaluer le rôle réel de ces influences neurohumorales sur la structure vasculaire. Bien que ce type d'expérimentation ait beaucoup apporté à la pharmacologie moléculaire, en raison de ses limites quant à la poursuite du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notre équipe de recherches favorise l'étude de ces mécanismes dans un contexte *in vivo*. La réponse observée dans ce contexte implique l'intégration d'influences multiples à l'intérieur de la paroi vasculaire et représente davantage le reflet de la complexité du remodelage vasculaire observé dans l'hypertension artérielle. Un nombre moins important de travaux ont été initiés concernant l'exploration des mécanismes intra-cellulaires *in vivo*. Il s'avère donc important d'encourager cette approche expérimentale, car elle permet de poursuivre la compréhension post-réceptorielle, dans l'optique d'identifier les événements intra-cellulaires pertinents à cibler dans la thérapeutique de l'hypertension artérielle. Ainsi, et contrairement à une approche *in vitro*, l'identification de cibles intra-cellulaires impliquées dans le développement du remodelage vasculaire, dans un contexte *in vivo* chez le rat, implique l'influence intégrée de facteurs locaux et systémiques ainsi que la contribution des paramètres hémodynamiques.

5.2.2 Critique de la procédure expérimentale

La procédure expérimentale développée afin de réaliser le travail présenté dans cette thèse de doctorat implique une stimulation à l'Ang II, à la NE ou à l'ET. Ces stimuli appliqués *in vivo* miment le potentiel physiopathologique associé à une hyperactivité du SRA, du SNS et à une production accrue d'ET qui sont intimement liées au remodelage vasculaire hypertrophique¹⁹. L'administration d'antagonistes spécifiques aux récepteurs de ces systèmes permet d'évaluer leur contribution endogène au remodelage vasculaire hypertrophique. Sachant qu'une stimulation chronique (14 jours), à l'aide d'Ang II et de NE permet d'induire un remodelage vasculaire hypertrophique des artères mésentériques²⁸², un modèle sub-aigu a été développé au cours des dernières années dans notre laboratoire, afin d'étudier dans un court intervalle de temps les mécanismes impliqués dans la phase précoce du développement du remodelage vasculaire^{335, 365}. La stimulation est induite à l'aide de mini-pompes osmotiques insérées dans le compartiment sous-cutané. Tout au long d'une période de vingt-six heures, une concentration constante d'Ang II, de NE ou d'ET est libérée et produit une augmentation de la synthèse protéique vasculaire. Parallèlement à ces stimulations, des antagonistes spécifiques pour les systèmes neurohumoraux peuvent être administrés à l'aide d'injections sous-cutanées. Ces interventions permettent d'évaluer l'importance de chacune des voies ciblées dans l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire stimulée de manière exogène. Ainsi, ce paramètre est évalué et est identifié comme un indice hatif de l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Cette approche représente donc un excellent modèle afin d'étudier les interactions impliquées dans la mise en place de l'hypertrophie de la paroi vasculaire. De plus, cette méthode permet d'évaluer certains éléments de la signalisation cellulaire qui pourraient potentiellement être importants à l'induction du remodelage vasculaire hypertrophique reliée à ces interactions neurohumorales.

Les avantages de l'approche in vivo

Dans la poursuite de la compréhension du remodelage vasculaire hypertrophique et dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques à cet égard, des avantages

favorisent l'utilisation de ce type de modèle *in vivo*. L'étude des interactions impliquées dans le remodelage vasculaire hypertrophique à l'aide de traitements pharmacologiques peut être évaluée en présence de conditions physiologiques et en présence d'une stimulation, mimant certaines conditions physiopathologiques. Bien que l'inhibition de fonctions cellulaires ne constitue pas une intervention désirable en présence de conditions normales, l'intervention en présence d'un état pathologique permet d'établir l'importance, d'un point de vue thérapeutique, de bloquer un système physiologique devenu hyperactif.

Par ailleurs, l'arbre artériel possède une hétérogénéité sur le plan structurel et fonctionnel, suggérant que les altérations associées au remodelage des artères de conductance et de résistance comportent des interactions spécifiques à la région vasculaire ciblée^{282, 332}. Ainsi, l'étude comparative des régions vasculaires peut être facilement entreprise à l'aide d'un modèle *in vivo*, contrairement aux modèles *in vitro*. D'ailleurs, à l'aide de cette méthodologie, il est démontré que le remodelage vasculaire hypertrophique produit par une stimulation neurohumorale induit une hypertrophie ainsi qu'une hyperplasie dans les artères de conductance³³², tandis que seule une hypertrophie cellulaire est détectée dans les artères de résistance²⁸². Sachant que le remodelage vasculaire représente l'intégration de la synthèse protéique, de la prolifération et de l'apoptose, des interactions distinctes entre les systèmes doivent prendre place entre les artères de conductance et les artères de résistance.

Les limitations de l'approche in vivo

Toutefois, l'investigation *in vivo* possède des inconvénients. Afin de déterminer l'hypertrophie de la paroi vasculaire, une perfusion de leucine tritiée a été effectuée. Une homogénéisation des tissus permet de quantifier la synthèse protéique qui est associée à l'incorporation de la leucine marquée. Cette approche évalue de manière non spécifique le taux de synthèse protéique à l'intérieur de la paroi vasculaire. C'est-à-dire que cette méthodologie ne permet pas d'évaluer la contribution réelle des types cellulaires impliqués dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. À la suite d'une homogénéisation

des tissus, l'identification des protéines impliquées dans les sentiers de signalisation cellulaire associés à l'hypertrophie de la paroi vasculaire n'est pas en mesure de nous informer sur le ou les types cellulaires auxquels cette signalisation est reliée. Par contre, il est possible de reconnaître, à l'aide de techniques histologiques, les sites exacts dans la paroi vasculaire où des changements protéiques et enzymatiques s'établissent³³⁵. L'analyse des interactions neurohumorales et de la signalisation associée à l'hypertrophie vasculaire a pour objectif d'évaluer le changement global observé dans la paroi vasculaire et cette limitation demeure donc secondaire.

L'influence hémodynamique constitue un autre facteur important à considérer lors de l'analyse des résultats obtenus *in vivo*. Il est connu que la pression artérielle, en soi, peut induire un effet hypertrophique³⁶⁴. Les agents pharmacologiques administrés et faisant l'objet de cette thèse permettent d'étudier les influences neurohumorale et locale dans le remodelage vasculaire hypertrophique. Toutefois, l'induction de ce type de remodelage vasculaire et la signalisation cellulaire qui sont sous-jacentes pourraient être associées aux changements hémodynamiques³⁴⁰. La stimulation exogène peut entraîner des changements de la pression artérielle expliquant pourquoi l'influence hémodynamique ne doit pas être exclue de notre analyse.

En résumé, l'approche expérimentale utilisée afin d'évaluer les interactions impliquées dans le développement de l'hypertrophie vasculaire est originale et elle aide à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ce phénomène physiopathologique. La flexibilité de ce modèle *in vivo* rend possible d'évaluer cet aspect dans différents types d'artères et dans un court intervalle de temps. Les études *in vivo* permettent aussi d'étudier l'importance réelle de chacun de ces systèmes dans le développement du remodelage vasculaire hypertrophique associé à un état pathologique où plusieurs systèmes neurohormonaux sont activés. De plus, à la suite de ces interactions, les études moléculaires effectuées à l'aide de ce modèle de stimulation *in vivo* donnent le moyen d'identifier des événements intra-cellulaires qui posséderaient un rôle significatif lors de l'hypertrophie de la paroi des artères de résistance.

5.3 INTERACTIONS NEUROHUMORALES ET HYPERTROPHIE DE LA PAROI VASCULAIRE

5.3.1 Hétérogénéité vasculaire

Dans cette thèse, le rôle des interactions neurohumorales et locales reliées au SRA, au SNS et à l'ET lors de la phase précoce du remodelage vasculaire hypertrophique a été évalué. Il est observé qu'en présence de conditions expérimentales où ces différents systèmes sont suractivés, un remodelage vasculaire hypertrophique du réseau artériel est induit^{230, 282, 507}. Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'hypertrophie de la paroi vasculaire semblent variables entre les artères de conductance et les artères de résistance, supportant l'idée que le développement de l'hypertrophie vasculaire implique des interactions neurohumorales différentes entre les types de vaisseaux artériels^{282, 332}.

Il demeure difficile d'expliquer pourquoi des interactions distinctes entre ces systèmes neurohumoraux prennent place entre les territoires vasculaires dans le remodelage vasculaire hypertrophique. Toutefois, la contribution de l'adventice et des changements de la matrice extra-cellulaire³³², suite à une stimulation neurohumorale chronique dans les artères de conductances, permettent de spéculer que l'importance variable des couches cellulaires formant la paroi artérielle entre les types d'artères soit non négligeable à l'égard des divergences de remodelage vasculaire. Sachant que l'activation du SNS est étroitement associée à la prolifération de la matrice extra-cellulaire dans les CMLVs aortiques⁴³⁰ et que le remodelage vasculaire de l'aorte implique une prolifération de la matrice extra-cellulaire *in vivo*³³², il est fort plausible que ces résultats expliquent le rôle central du SNS dans la cascade d'interactions neurohumorales prenant place dans ce territoire artériel. En revanche, l'ET est bien identifié comme le facteur central de l'hypertrophie vasculaire produite par l'Ang II et la NE dans les artères de résistance. Ainsi, l'ET semble posséder un rôle essentiel dans le développement physiopathologique des artères impliquées dans le contrôle de la pression artérielle. Ces observations constituent la base afin d'évaluer en aval au SNS dans les artères de

conductance et en aval à l'ET dans les artères de résistance, les mécanismes moléculaires pouvant expliquer le remodelage vasculaire hypertrophique.

5.3.2 Rôle central de l'endothéline et aspects thérapeutiques dans

l'hypertension artérielle

La position en aval de l'ET dans la cascade d'interactions impliquant le SRA et le SNS suggère que ce médiateur est central à l'induction de l'hypertrophie de la paroi des artères de résistance et démontre l'intérêt de cibler ce médiateur afin de prévenir le développement des complications de l'hypertension artérielle. Toutefois, le rôle de l'ET ne s'applique pas à tous les types d'hypertension. En présence d'hypertension artérielle modérée à sévère et parmi certaines conditions expérimentales telle lorsqu'une concentration importante d'Ang II est infusée, l'expression de l'ET augmente significativement dans les territoires vasculaires formant les artères de résistance^{19, 237}. De même, lorsqu'une concentration accrue d'Ang II est générée de manière endogène, l'expression d'ET est augmentée à l'intérieur du territoire coronarien⁵⁰⁷. Il demeure donc plausible que la plus grande production d'ET, retrouvée chez certains patients, pourrait être associée à l'Ang II et contribuerait au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance. À cet égard, une hétérogénéité vasculaire a aussi été proposée concernant l'interaction Ang II – ET et la réactivité vasculaire. Il existe des évidences expérimentales qui suggèrent un rôle d'intermédiaire à l'ET dans l'effet vasoconstricteur de l'AngII²⁷⁷. Ceci n'est pas observé dans l'aorte, mais progressivement lorsqu'on atteint le territoire des artères de résistance. Cette constatation est très intéressante, car sachant que le contrôle de la pression artérielle est associé aux artères situés en aval dans l'arbre artériel, ce résultat suggère encore une fois un rôle de l'ET dans l'action de l'Ang II. D'ailleurs, une étude expérimentale chez l'humain a permis d'appuyer cette conclusion²⁷⁸. Bien que certains travaux soutiennent que cette interaction Ang II – ET possède un rôle dans le développement de l'hypertension artérielle, il est probable que le bénéfice associé au blocage du système de l'ET implique davantage la prévention du

développement du remodelage des artères de résistances associé à cette condition et donc aux dommages potentiels des organes cibles.

Chez l'humain, depuis quelques années, l'utilisation d'antagoniste des récepteurs à l'ET dans l'hypertension artérielle a captivé l'intérêt des spécialistes. Bien que l'utilisation d'un antagoniste mixte pour les récepteurs $ET_{A/B}$ ainsi que l'utilisation d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A ont démontré pouvoir diminuer la pression artérielle²³⁸, ces agents ne seront pas développés pour le traitement de l'hypertension essentielle. En plus d'effets secondaires importants, ces agents antihypertenseurs ne semblent pas accorder de bénéfices supplémentaires en comparaison aux traitements conventionnels. Toutefois, une utilisation clinique semble toujours envisageable pour l'antagoniste du récepteur ET_A dans le traitement de l'hypertension artérielle. En présence de condition hypertensive plus sévère, et où l'hypertension artérielle est résistante aux traitements des antihypertenseurs déjà existants, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur ET_A pourrait être bénéfique²¹². Il importe donc de considérer le type de patients hypertendus auxquels l'administration d'antagonistes des récepteurs à l'ET devraient être appliquée. Il est fort plausible que l'efficacité de l'antagoniste du récepteur ET_A ne serait significative qu'en présence d'une condition physiopathologique où l'expression de l'ET dans la paroi des artères de résistance serait augmentée. À ma connaissance, très peu d'études ont évalué l'expression de l'ET dans les artères de résistance de patients hypertendus²³⁰. De plus, bien qu'il ne soit pas démontré, il est plausible de prétendre que cette activation de l'ET soit associée au SRA²³⁷. L'élévation de la pression artérielle et spécialement le développement du remodelage vasculaire hypertrophique implique l'activation du SRA et le recrutement de l'ET. Ainsi, il pourrait s'avérer avantageux, chez certains patients hypertendus, d'inclure un antagoniste des récepteurs de l'ET aux inhibiteurs du SRA déjà prescrits. Dans ce cas, un abaissement de la pression artérielle et une inhibition du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance pourraient être observables chez ces derniers.

Il faut toutefois se souvenir que l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A semble efficace afin de prévenir plutôt que faire régresser les effets délétères induits par

le SRA^{236, 271}. Il est possible que certains patients résistant aux traitements antihypertenseurs bénéficient de l'ajout d'un antagoniste du récepteur ET_A. Néanmoins, à la lumière des résultats obtenus précédemment, l'administration de l'antagoniste ET_A doit être appliquée tôt suite à l'activation neurohumorale. Lorsque l'antagoniste du récepteur ET_A est administré longtemps après l'établissement du processus physiopathologique, une régression de l'hypertension et du remodelage vasculaire hypertrophique semble moins probable²⁸². Donc, bien qu'une augmentation de l'expression de l'ET au niveau de la paroi des artères de résistance contribue au développement du remodelage chez certains patients, il importe de réaliser que ce rôle central de l'ET dans les artères de résistance est précoce et transitoire²⁸².

5.4 SIGNALISATION CELLULAIRE ASSOCIÉE AU REMODELAGE VASCULAIRE HYPERTROPHIQUE :

DIVERGENCES IN VIVO - IN VITRO, COMMENT RÉCONCILIER LES DEUX ?

À l'intérieur de cette thèse, certains éléments de la signalisation cellulaire impliquée dans l'interaction Ang – ET pour le contrôle de la synthèse protéique vasculaire ont été étudiés. Les résultats obtenus ont permis d'identifier des éléments de la signalisation cellulaire nécessaires à la production de l'ET. Toutefois, des interrogations persistent à l'égard des événements intra-cellulaires permettant l'action de l'ET dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire. Ces résultats qui ont été rapportés dans le deuxième et le troisième manuscrit de cette thèse seront discutés afin de mieux comprendre les divergences s'établissant entre ces derniers et les résultats de la signalisation cellulaire retrouvés dans la littérature et obtenus dans un contexte *in vitro*.

5.4.1 Signalisations cellulaires impliquées en amont dans l'interaction angiotensine II - endothéline

L'observation saillante du deuxième manuscrit repose sur le rôle essentiel des tyrosines kinases non-réceptorielles Src, dans l'interaction Ang – ET, dans la paroi des artères de

résistance *in vivo*. En accord avec les résultats obtenus dans le premier manuscrit, l'expression de la prepro-ET est stimulée par l'Ang II. De plus, l'inhibition des tyrosines kinases Src permet de conclure que ces dernières sont indispensables à l'induction de l'ET et permettent ainsi l'hypertrophie de la paroi vasculaire stimulée par l'Ang II.

Des travaux *in vitro*, à l'aide de CMLVs, provenant d'artères de résistance de patients hypertendus ont permis d'étudier le rôle des tyrosines kinases Src dans la signalisation cellulaire de l'Ang II⁴⁷¹. L'activation de c-Src s'élève rapidement après 30 secondes de stimulation. Elle semble augmenter davantage après 1 minute et persiste pour une période de dix minutes. Il semble donc y avoir, *in vitro*, une activation rapide et transitoire des tyrosines kinases Src, mais qu'en est-il dans des conditions *in vivo* ? Il est plus difficile d'étudier dans le temps l'activation de ces tyrosines kinases. Toutefois, nous avons évalué, *in vivo*, la phosphorylation de c-Src à la suite d'une stimulation de vingt-six heures par l'Ang II dans les petites artères mésentériques (Données non-publiées). Étonnamment, il a été impossible de détecter une activation de cette tyrosine kinase. À l'exemple des travaux effectués *in vitro*, la stimulation *in vivo* par l'Ang II a aussi été évaluée en présence de PP2, un inhibiteur des tyrosines kinases non-réceptorielle Src. Les résultats obtenus suggèrent que l'administration du PP2 prévient l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire stimulée par l'Ang II, *in vivo* dans les petites artères mésentériques. Ainsi, les tyrosines kinases Src contribuent à la signalisation cellulaire *in vitro* et *in vivo*, toutefois la contribution exacte de c-Src à l'action de l'Ang II demeure mal comprise *in vivo*.

Aucune étude *in vivo* a précédemment tenté d'établir la contribution des tyrosines kinases Src dans l'action vasculaire hypertrophique de l'Ang II. Bien qu'il soit établi *in vitro* que c-Src constitue le sous-type des tyrosine kinases Src le plus important, rien ne laisse croire qu'il constitue aussi le sous-type le plus influant dans des conditions *in vivo* dans la paroi des artères de résistance. À cet égard, il est possible de spéculer que différents types de tyrosines kinases de la famille Src participent dans l'action de l'Ang II dans la paroi de ces artères. Par ailleurs, l'activation de l'Ang II a été induite de manière distincte entre les études *in vitro* et *in vivo*. La stimulation *in vitro* est associée à

l'administration d'un bolus sur un intervalle de temps très court (<10 minutes)^{471, 484}. Au contraire, la stimulation produite *in vivo* constitue une perfusion continue qui s'est poursuivie sur un intervalle de temps beaucoup plus long, soit de vingt-six heures. Il s'avère donc plausible que la stimulation de l'Ang II ait induit une activation transitoire de c-Src et qu'au temps choisi pour l'évaluer (26 heures), elle ait déjà pu être rétablie au niveau basal. Ainsi, il aurait été pertinent, mais difficile *in vivo*, d'évaluer, l'activation de c-Src, à différents temps lors de la stimulation de l'Ang II. Toutefois, l'administration du PP2 a été effectuée au cours des cinq dernières heures précédant la fin de la stimulation de l'Ang II et il a été possible d'inhiber l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire. Ceci suggère que l'activation des tyrosines kinases Src soit induite au cours de la phase tardive de la stimulation de l'Ang II. Somme toute, l'action spécifique de notre inhibiteur pour les tyrosines kinases Src a pu être démontrée. Plusieurs substrats sont induits à la suite de l'activation des tyrosines kinases de la famille Src⁴⁸⁴ et le cortactin compte parmi ces protéines qui constituent des cibles afin d'évaluer l'activation de ces tyrosines kinases. Ainsi, les observations obtenues, concernant l'activation de cortactin en présence d'une stimulation par l'Ang II et la prévention de son activation suivant une administration de PP2, appuient l'idée que les tyrosines kinases de la famille Src sont réellement impliquées dans les effets de l'Ang II *in vivo*.

La contribution du sentier des MAP kinases a été évaluée dans notre étude. En accord avec les observations rapportées *in vitro*,^{470, 471, 484} les résultats obtenus suite à une stimulation de vingt-six heures par l'Ang II démontrent une activation du sentier ERK. De plus, les tyrosines kinases Src semblent être essentielles à l'Ang II afin d'induire ce sentier de signalisation. Sans vraiment comprendre pourquoi, nos observations suggèrent une activation de ERK1, contrairement à une activation de ERK1/2 dans plusieurs travaux effectués à l'aide de CMLVs en culture. Ainsi, le sentier ERK1/2 est induit *in vitro* à la suite d'une stimulation par l'Ang II et similairement à nos résultats, l'administration de PP2 prévient cet effet⁴⁷¹. Sachant que les tyrosines kinases Src sont recrutées rapidement par l'Ang II afin d'induire l'expression de la prepro-ET, il est plausible que le sentier ERK soit activé par ces tyrosines kinases afin d'induire, plus en

aval, le gène de l'ET. *In vitro*, dans des CMLVs en culture, ERK1/2 est identifié comme un intermédiaire indispensable à l'induction de l'expression de l'ARNm de la prepro-ET par l'AngII⁵⁰⁸. Par ailleurs, dans notre étude, le rôle du sentier ERK n'a pas été évalué quant à l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire stimulée par l'Ang II. Bien qu'*in vitro* il soit proposé que ce sentier de signalisation soit nécessaire à l'effet hypertrophique produit par l'Ang II, nos résultats permettent de supposer que l'implication du sentier ERK à l'action de l'Ang II soit importante à la production de l'ET, mais comme il sera discuté par la suite, son rôle en aval dans la signalisation cellulaire associé à l'effet de l'ET semble inexistant *in vivo*.

5.4.2 Signalisations cellulaires impliquées dans l'effet de l'endothéline

La poursuite de la compréhension des événements intra-cellulaires *in vivo* impliqués dans l'action vasculaire hypertrophique de l'ET représente un aspect important dans l'étude de cette thèse. Bien qu'il existe des évidences suggérant une activation des tyrosines kinases Src par l'ET⁴⁹⁹, ceci n'a pu être confirmé par notre travail. La transactivation du récepteur de l'EGF a fait l'objet d'une investigation, comme événement intra-cellulaire potentiellement impliqué en aval de l'ET. Cet intermédiaire n'est pas plus relié à l'effet de l'ET *in vivo*. Bien que la transactivation du récepteur de l'EGF par l'ET a aussi été observée dans des préparations cellulaires^{491, 500, 503}, il est fort possible que les divergences *in vitro* et *in vivo* concernant le rôle de ces éléments de la signalisation cellulaire soient reliées aux conditions expérimentales. Les concentrations d'ET utilisées *in vivo* dans notre travail induisent une augmentation d'ET plasmatique et tissulaire. Ces changements ont été évalués à l'intérieur du premier manuscrit de cette thèse ainsi qu'à l'intérieur d'une étude effectuée par des membres de notre laboratoire⁵⁰⁹. Ainsi, contrairement à nos concentrations obtenues qui demeurent dans un intervalle physiopathologique, il est fort possible que les observations effectuées *in vitro* impliquent des concentrations d'ET beaucoup plus élevées et qu'en présence de tels niveaux d'ET, des sentiers de signalisation autres que ceux impliqués dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire *in vivo* sont activés. En ce sens, des travaux récents

effectués au sein de notre laboratoire ont permis de proposer la contribution de la P70S6 kinase à l'action hypertrophique de l'ET *in vivo*⁵⁰⁹. De plus, selon la concentration d'ET administrée, des mécanismes cellulaires distincts semblent être induits.

Sans discréditer les résultats obtenus *in vitro*, il s'avère important d'un point de vue physiopathologique de poursuivre les études de la signalisation cellulaire de l'ET *in vivo*. En effet, ceci permettra une évaluation plus réelle des sentiers de signalisation cellulaire impliqués dans l'action vasculaire hypertrophique de l'ET. De plus, sachant que l'administration d'antagonistes de l'ET ne permet pas de faire régresser le remodelage vasculaire hypertrophique²⁸², l'étude des événements intra-cellulaires qui pourraient être impliqués en aval de l'ET et qui seraient importants dans le maintien de l'hypertrophie de la paroi vasculaire constitue une perspective intéressante. Ainsi, des cibles thérapeutiques pourraient être identifiées afin de renverser le remodelage vasculaire hypertrophique.

5.5 INFLUENCES CARDIOVASCULAIRES ET RÉNALES DE L'ANGIOTENSINE II : L'ENDOTHÉLINE POSSÈDE-T-IL UN RÔLE CENTRAL ?

Le SRA influence le fonctionnement et la structure du système cardiovasculaire et rénal. Sachant que l'Ang II induit la production de l'ET à l'intérieur de plusieurs types tissulaires, il n'est donc pas surprenant de constater, à la lumière des nombreuses études sur le rôle de cette interaction, que les effets physiologiques et physiopathologiques de l'Ang II s'établissent via l'action de l'ET. Bien qu'il soit très stimulant de songer à l'importance de cette interaction Ang – ET dans des situations physiopathologiques en clinique, il n'en demeure pas moins que des controverses expérimentales persistent à l'égard de cette interaction qui semble pouvoir jouer un rôle dans le développement de diverses conditions physiopathologiques où les systèmes cardiovasculaire et rénal sont impliqués. Au cours de cette thèse, l'investigation de cette interaction Ang II – ET a été ciblée au territoire vasculaire, toutefois des travaux ont aussi abordé le rôle de cette interaction au-delà de ce territoire. Afin de bien évaluer le rôle indispensable de l'ET à l'action de l'Ang II, une analyse de cette interaction à l'intérieur du territoire vasculaire, myocardique et rénal sera présentée.

5.5.1 Territoire artériel

L'importance de cette interaction Ang II – ET a stimulé l'intérêt de plusieurs à l'égard de son rôle dans la régulation du territoire artériel. Bien qu'il soit proposé que l'ET soit nécessaire à l'Ang II dans son effet hémodynamique, seul un effet hypotensif partiel est rapporté à l'aide des antagonistes des récepteurs de l'ET (Tableau 1.2). Or, les évidences expérimentales concernant la protection des organes cibles démontrent que les effets vasculaires associés aux antagonistes des récepteurs de l'ET impliquent davantage la protection de la fonction endothéliale, l'hypertrophie, la synthèse de tissu fibreux et la production de stress oxydatif^{18, 236, 332, 510}.

Dysfonction endothéliale

Le développement physiopathologique de l'hypertension artérielle est associé à une altération de la fonction endothéliale³⁶³. Bien que l'altération de la fonction endothéliale puisse contribuer à l'élévation de la pression artérielle, le rétablissement de la fonction endothéliale ne semble pas contribuer au contrôle de la pression artérielle³⁶³. La dysfonction endothéliale se définit généralement comme une détérioration de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium associée au NO. Ainsi, l'endothélium possède, via la libération de médiateurs vasodilatateurs, un rôle important dans le contrôle du tonus artériel. Toutefois, la contribution de ces médiateurs endothéliaux permet aussi la prévention de thrombus et la préservation de l'endothélium s'oppose au développement de plaques athérosclérotiques dans les artères de conductance. Ainsi, un dysfonctionnement endothélial représente, au-delà de son influence sur le tonus artériel, un indice du dommage des organes cibles³⁶³. Il est démontré qu'une stimulation chronique à l'Ang II produit dans un modèle de rats une dysfonction endothéliale. Cet effet semble impliquer l'ET, car suite à l'administration d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A, la réponse dépendante de l'endothélium est normalisée au niveau de l'aorte²²¹. Dans cette condition, il est suggéré que l'amélioration de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium implique le récepteur ET_B (le récepteur ET_A étant bloqué). Sachant que la stimulation chronique par l'Ang II induit la production de l'ET, une activation accrue du récepteur ET_B (le récepteur ET_A étant bloqué) est produite, et via la libération du NO et de la PGI₂ un effet vasodilatateur est favorisé. Par ailleurs, un dysfonctionnement endothélial est aussi observé dans le développement physiopathologique du modèle expérimental de rat spontanément hypertendu SHR⁵¹¹. Dans ce modèle d'hypertension, l'administration chronique d'un antagoniste spécifique pour le récepteur AT₁ améliore significativement la fonction endothéliale associée au NO plasmatique. Simultanément, une chute de l'ET plasmatique est observée suggérant aussi un lien entre le SRA, l'ET et la dysfonction endothéliale⁵¹¹. Bien que le rôle de l'ET à cette amélioration de la fonction endothéliale demeure nébuleux, il est suggéré chez le rat SHR que l'activation du récepteur ET_B entraîne une réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium complètement altérée⁵¹². Ainsi, le blocage du récepteur AT₁ favorise via l'activation du récepteur AT₂ une production accrue de NO. À son tour, il

est possible que le NO inhibe la formation de l'ET¹⁶³. Bien qu'il semble impossible de déterminer si l'augmentation d'ET plasmatique représente en soi un danger, elle renseigne sur l'état de l'endothélium. Ainsi, il est logique de prétendre qu'une normalisation du contenu plasmatique en ET, à la suite d'un blocage du SRA, implique une régression du dommage de la structure et de la fonction endothéliale.

Remodelage vasculaire hypertrophique

Tel que mentionné à l'intérieur de cette thèse, les interactions impliquant l'Ang II, le SNS et l'ET ont permis d'établir un rôle central de l'ET dans l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire dans les artères de résistance. En revanche, l'augmentation de la synthèse protéique vasculaire implique des interactions distinctes entre ces facteurs dans la paroi des artères de conductance. Le rôle de l'ET est plus complexe dans les artères de conductances. Il semble pouvoir induire la production locale d'Ang II, tout comme il peut être nécessaire à l'action de l'Ang II. Le rôle de l'aldostérone n'a pas vraiment été abordé à l'intérieur de cette thèse, toutefois il est connu que l'Ang II recrute l'aldostérone afin d'induire son action sur le système cardiovasculaire. Concomitamment aux observations rapportées à l'égard de l'interaction Ang II – ET dans les artères de conductance, l'ET peut stimuler la production d'aldostérone, comme l'aldostérone peut nécessiter l'ET afin de produire ses effets^{267, 442}. Ces derniers impliquent la prolifération de tissus fibreux et l'hypertrophie qui peuvent être prévenues par un traitement avec un antagoniste du récepteur ET_A. *In vitro*, la production de stress oxydatif constitue aussi un élément relié à l'interaction Ang II – ET. Bien que cet aspect n'ait pas été discuté à l'intérieur de cette thèse, il demeure essentiel de souligner que l'Ang II stimule la production de stress oxydatif qui active par la suite la synthèse de l'ET⁵¹⁰. De plus, un effet rétroactif positif semble s'établir, car l'ET augmente à son tour la production de stress oxydatif⁵¹³. Cette production de stress oxydatif peut contribuer aux altérations vasculaires, tel le dysfonctionnement endothélial⁵¹⁴ et le remodelage vasculaire hypertrophique⁵¹⁵. Somme toute, une association complexe semble s'établir entre l'Ang II, l'ET, l'aldostérone et le stress oxydatif au niveau vasculaire. De plus, l'ET libéré par les cellules endothéliales, induit via ses récepteurs ET_A et ET_B localisés aux CMLVs, les

effets de l'Ang II, telle l'hypertrophie, la prolifération de tissus fibreux et l'augmentation du stress oxydatif.

En résumé, l'interaction Ang II – ET influence la régulation du compartiment artériel. Certaines études démontrent un rôle de l'ET dans l'effet hypertenseur de l'Ang II. Toutefois, les évidences expérimentales exposant le rôle ubiquitaire de l'ET dans la dysfonction endothéliale ainsi que dans le remodelage vasculaire hypertrophique suggèrent que les antagonistes des récepteurs de l'ET préviennent davantage les altérations de la structure vasculaire produite par l'Ang II que ses effets hémodynamiques.

5.5.2 Remodelage cardiaque

L'interaction Ang II – ET a aussi été étudiée *in vitro* à l'aide de préparation de cardiomyocytes et de fibroblastes^{516,517}. L'Ang II stimule la production de l'ET dans ces préparations. De plus, il est possible d'inhiber, à l'aide d'un antagoniste des récepteurs à l'ET, l'effet hypertrophique induit par la stimulation de l'Ang II⁵¹⁶. À la suite de ces résultats obtenus *in vitro*, il semble donc plausible de spéculer que l'ET devrait, du moins à un certain degré, contribuer au remodelage cardiaque induit dans des conditions pathologiques où le SRA est hyperactivé.

Les résultats obtenus *in vivo* semblent toutefois controversés. Chez le rat, en présence d'une perfusion chronique à l'Ang II, le contenu en ET n'est pas augmenté significativement dans la paroi cardiaque⁵¹⁸. Néanmoins, dans un modèle d'hypertension rénovasculaire 2K/1C, il semble qu'un effet antihypertrophique cardiaque se manifeste suite à l'administration d'un antagoniste mixte des récepteurs $ET_{A/B}$ ²⁷⁵. De plus, suite à une perfusion chronique à l'Ang II, l'administration d'un antagoniste spécifique pour le récepteur ET_A prévient le même effet⁵¹⁹. À l'opposé, d'autres études utilisant les mêmes modèles rapportent que l'intervention pharmacologique de ces antagonistes pour les récepteurs de l'ET ne prévient pas l'hypertrophie cardiaque^{276, 520}. Le rôle exact de l'ET

demeure donc nébuleux. Le remodelage cardiaque peut impliquer deux phénomènes. Il y a une hypertrophie de la paroi ventriculaire, mais aussi une prolifération du tissu fibreux cardiaque²⁷⁶. Bien qu'il soit impossible d'observer une prévention de l'hypertrophie de la paroi ventriculaire à l'aide d'un modèle d'hypertension rénovasculaire, une prévention de la synthèse du tissu fibreux cardiaque est rapportée suite à l'administration d'un bloqueur mixte $ET_{A/B}$ ²⁷⁶. Sachant que le récepteur ET_B est largement exprimé au niveau des fibroblastes cardiaques, il est suggéré que cette prévention soit reliée à ce récepteur. De plus, cet effet induit par l'antagoniste $ET_{A/B}$ ne semble pas découler d'un effet secondaire à une réduction de la pression artérielle. À cet égard, l'influence hémodynamique des antagonistes des récepteurs de l'ET demeure une question controversée⁴³³. *In vivo*, il a déjà été proposé que l'effet antihypertrophique cardiaque des antagonistes ET_A soit associée à son effet antihypertenseur⁴⁶⁰. De plus, ce même antagoniste améliore la fonction cardiaque chez des rats transgéniques pour le gène de la rénine sans démontrer une amélioration de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque⁵²¹. Il est aussi suggéré que le blocage du récepteur ET_A ne permet pas la prévention de l'hypertrophie cardiaque induit par l'Ang II de manière indépendante de la pression artérielle⁵²⁰. En opposition à ces données, il est démontré à l'intérieur de deux études que le blocage du récepteur ET_A peut être associé, indépendamment de son effet hémodynamique, à une prévention et à une régression du remodelage cardiaque^{275, 519}.

En résumé, la situation concernant le rôle de l'ET et le remodelage cardiaque associé à l'hyperactivité du SRA est complexe. Il y a plusieurs facteurs à considérer. La contribution réelle de l'influence directe de l'ET et de son effet indirect via la modulation hémodynamique demeure mal comprise. Le remodelage cardiaque pourrait impliquer les cardiomyocytes et les fibroblastes, toutefois les résultats sont variables d'une étude à l'autre. De plus, le rôle exact des récepteurs ET_A et ET_B semble encore mal défini quant à l'hypertrophie et à la prolifération de la fibrose cardiaque. Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés et les résultats discordants obtenus empêchent d'attribuer fermement un rôle central direct de l'ET dans le remodelage cardiaque associée à l'Ang II.

5.5.3 Interactions rénales

L'effet protecteur rénal des antagonistes ET_A a été étudié dans le contexte de l'hypertension artérielle et de la défaillance rénale. Il est proposé que l'action de ces antagonistes implique un effet indépendant de la pression artérielle au niveau rénal²⁶⁸. Toutefois, cette opinion n'est pas partagée par tous et des controverses concernant le rôle indispensable de l'ET à l'action de l'Ang II au niveau rénal demeurent un sujet important de discussions⁵²².

Suite à une stimulation chronique à l'Ang II chez le rat, il est démontré que le contenu rénal en ET augmente significativement⁵¹⁸. L'expression accrue de l'ARNm de la prepro-ET a aussi été démontrée dans la portion corticale et médullaire du néphron suite à une stimulation chronique à l'Ang II chez le rat⁵²³. Bien qu'il soit possible que cette élévation soit reliée à un effet direct de l'Ang II, il demeure plausible qu'elle soit tributaire d'un effet indirect relié à l'élévation de la pression artérielle. Par ailleurs, l'hypertension artérielle induite par l'Ang II implique une augmentation de la résistance vasculaire rénale et l'intervention de l'antagoniste du récepteur ET_A permet de prévenir ce changement hémodynamique au niveau rénal. De plus, il est rapporté que l'antagoniste du récepteur ET_A rétablit à la normale la filtration glomérulaire qui est altérée suite à la stimulation chronique à l'Ang II⁵²³. Ces résultats sont reliés à d'autres observations, car l'amélioration de la fonction rénale, à l'aide d'un antagoniste du récepteur ET_A a aussi été observée dans différentes études impliquant une hypertension artérielle stimulée par l'Ang II^{272,524}. À la lumière de ces résultats, l'influence de l'Ang II au niveau rénal semble intimement reliée à un effet hémodynamique. De plus, l'effet antihypertenseur observé en présence de l'antagoniste du récepteur ET_A suggère le questionnement suivant : Est-ce que la réduction de la pression artérielle, induit par l'administration d'un antagoniste ET_A explique la préservation de la fonction et de la structure rénale ?

Il existe des évidences expérimentales qui suggèrent un rôle direct, indépendamment de la pression artérielle, de l'ET dans les altérations de la fonction et de la structure rénale²⁶⁸. La grande majorité de ces études ont été effectuées à l'aide de modèles

expérimentaux n'impliquant pas une stimulation du SRA. Toutefois, indépendamment de la pression artérielle, un effet associé à l'interaction Ang II – ET au niveau rénal peut être observé. Ces résultats impliquent davantage des changements de la structure des artères rénales et non des altérations directement associées à la fonction rénale^{525, 526}.

Par ailleurs, il est proposé que l'ET constitue un facteur important pour le développement de la défaillance rénale, car il induit la prolifération de cellules mésangiales et stimule le développement de la fibrose glomérulaire²⁶⁸. Toutefois, à l'aide d'un modèle expérimental de défaillance rénale, l'administration de l'antagoniste mixte ET_{A/B} et spécifique pour le récepteur ET_A ne permet pas d'induire une réduction de la pression artérielle, une réduction de la protéinurie ou une amélioration de la filtration glomérulaire⁵²⁷. De plus, bien qu'il soit démontré que le blocage du SRA atténue les dommages rénaux associés au développement de cet état pathologique, l'ajout d'antagonistes des récepteurs de l'ET n'apporte aucune protection supérieure comparativement au blocage unique du SRA⁵²⁷. Ceci suggère donc que la contribution du SRA au développement de l'insuffisance rénale ne nécessite pas le recrutement de l'ET. À l'aide du même modèle expérimental, il est aussi rapporté qu'un antagoniste du récepteur ET_A peut réduire la pression artérielle, sans toutefois diminuer l'excrétion protéinique et la clairance de la créatinine⁵²⁸. Ainsi, ces résultats suggèrent que le blocage du SRA et non celui de l'ET permet de réduire les altérations de la fonction et de la structure glomérulaire associées au développement de l'insuffisance rénale.

À l'aide de modèle de rats transgéniques, le rôle de l'interaction Ang – ET a aussi fait l'objet d'une étude à l'égard de la protection rénale. Des marqueurs associés à l'inflammation au niveau rénal sont observés dans un modèle de rats transgéniques surexprimant les gènes humains de la rénine et de l'angiotensinogène (hRen/hAgt). À la suite de l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A, il est démontré que l'expression de ces marqueurs inflammatoires chute, suggérant que l'action délétère reliée au SRA implique l'ET⁴⁰⁸. Toutefois, considérant l'effet antihypertenseur de l'antagoniste ET_A, le rôle direct de l'ET est discutable. Il est suggéré par certains auteurs que l'action des antagonistes des récepteurs de l'ET, concernant les dommages de la

fonction et de la structure rénale, implique inévitablement une baisse de la pression artérielle dans les modèles expérimentaux où le SRA est activé⁵²⁹. Ainsi, l'ET ne serait pas un intermédiaire à l'action délétère de l'Ang II au niveau rénal.

Beaucoup de travaux ont été effectués afin d'élucider le rôle central de l'ET à l'action de l'Ang II. À la lumière de ces travaux, il semble que ce rôle indispensable de l'ET ne soit pas impliqué à tous les niveaux du système cardiovasculaire et rénal. Le territoire artériel est assurément l'aspect du système cardiovasculaire où les évidences de l'interaction Ang - ET sont les plus convaincantes. À la suite des résultats obtenus à l'intérieur de cette thèse, le rôle central de l'ET à l'action de l'Ang II dans le remodelage vasculaire hypertrophique a davantage été associé à un effet indépendant de la pression artérielle. Il demeure impossible de nier que l'ET possède un rôle dans l'hypertension artérielle induite par l'Ang II, mais sa contribution semble moins importante qu'à l'égard de son action sur la structure vasculaire. De plus, l'ET ne semble pas posséder un rôle aussi important à l'action délétère cardiaque et rénale de l'Ang II. L'interaction Ang - ET implique différents aspects au niveau cardiaque et l'action hémodynamique pourrait contribuer largement au remodelage cardiaque. De plus, au niveau rénal, il semble que le rôle de l'ET soit associé, indépendamment de la pression artérielle, aux altérations de la structure artérielle.

5.6 RÔLE CENTRAL DE L'ENDOTHÉLINE DANS L'EFFET DE L'ANGIOTENSINE II CHEZ L'HUMAIN

Dans le but de discuter de la pertinence de nos résultats expérimentaux concernant l'importance de l'interaction Ang II – ET et le rôle central de l'ET chez l'humain, certaines conditions cliniques où une hyperactivité de cet axe est rapportée seront mises en relief. L'activité hémodynamique des antagonistes des récepteurs à l'ET a surtout été étudiée chez des patients. Or, il existe des situations cliniques fortes intéressantes, d'un point de vue physiopathologique, où un questionnement concernant l'interaction Ang II – ET et le blocage de l'ET semblent importants quant au traitement de ces conditions physiopathologiques. Ainsi, le blocage du système de l'ET pourrait produire un bénéfice substantiel à l'intervention thérapeutique qui est utilisée dans des conditions pathologiques telle qu'en présence d'hypertension rénovasculaire, d'obésité et suite à une transplantation rénale.

5.6.1 Hypertension artérielle et expression de l'ET chez l'humain

Le contenu plasmatique en ET demeure généralement normal ou quelque peu élevé chez les patients atteints d'HE⁴³³. Une élévation de l'ET plasmatique chez des jeunes patients non-traités et atteints d'HE a été rapportée⁵³⁰. Ceci concorde avec l'idée que l'ET est important dans la phase précoce du développement de l'hypertension artérielle. D'ailleurs, bien que l'ET plasmatique augmente avec l'âge, chez les patients hypertendus âgés, le taux d'ET plasmatique n'est pas plus élevé que chez les personnes saines ayant le même âge^{530, 531}. Il est établi que la concentration plasmatique en ET est largement plus importante chez les patients noirs américains hypertendus comparativement à des patients blancs atteints d'HE⁵³². Lorsque les patients noirs sont soumis à une thérapie antihypertensive, le contenu plasmatique en ET chute parallèlement à la baisse de la pression artérielle. Ceci suggère que l'élévation de l'ET plasmatique constitue une conséquence de l'hypertension artérielle et peut participer au dommage des organes cibles²³¹. Cette élévation de l'ET semble associée à la plus grande

sensibilité au sel qui est observée chez ces derniers. Il semble qu'une corrélation positive existe entre la concentration plasmatique en ET et la présence d'une pression artérielle très élevée. De plus, cette concentration accrue en ET reflète l'altération de la fonction endothéliale et le dommage des organes cibles qui sont observés en présence d'hypertension artérielle sévère²³¹. Par ailleurs, la présence d'une concentration plasmatique élevée en ET a aussi été rapportée chez des patients atteints d'hypertension rénovasculaire^{533, 534}. Un nombre important de conditions pathologiques associées ou non à l'hypertension présentent une élévation de la concentration plasmatique en ET^{231, 433}. Ceci implique les patients sensibles au sel, les obèses, les patients résistant à l'insuline, les patients atteints d'HE sévère et les femmes atteintes de pré-éclampsies lors de la grossesse. Des formes d'hypertension secondaire, telle que suite à un traitement à la cyclosporine présentent aussi une concentration d'ET plasmatique accrue⁵³⁵. De même, une plus grande concentration d'ET est rapportée en présence d'insuffisance rénale chronique⁵³⁶, d'insuffisance cardiaque⁵³⁷ et d'athérosclérose⁵³⁸. Somme toute, des résultats hétérogènes existent concernant la présence d'ET dans le compartiment vasculaire chez les patients atteints d'hypertension artérielle. Tout dépendant des sous-groupes de patients sélectionnés, des différences sont observables. Ainsi, bien que la concentration plasmatique en ET soit souvent la seule mesure possible à effectuer afin d'identifier le rôle de l'ET dans le développement physiopathologique de l'hypertension en clinique, il demeure que cette évaluation doit être considérée avec beaucoup de réserve.

L'ET est avant tout une hormone autocrine et paracrine qui est préférentiellement libérée de manière abluminale²³¹. La concentration d'ET plasmatique ne reflète donc pas la production locale qui informe davantage sur le rôle de l'ET dans les changements de la structure vasculaire. Bien que la concentration plasmatique puisse représenter un indice de la production d'ET, elle implique aussi la clairance et la dégradation de l'ET²²⁹. Ainsi, les variations plasmatiques ne sont pas nécessairement le reflet des changements pouvant être observés à l'intérieur de la paroi artérielle. À la suite d'une biopsie sous-cutanée, au niveau glutéal, l'évaluation de l'expression de l'ARNm de la prepro-ET à l'intérieur des petites artères de résistances de cette région n'a pu illustrer de différences

entre les sujets témoins et les patients atteints d'hypertension essentielle²³⁰. En revanche, la même intervention effectuée chez des patients atteints d'hypertension artérielle sévère montre une augmentation significative de l'expression du gène de l'ET²³⁷. De plus, il est démontré chez des patients hypertendus et/ou atteints d'athérosclérose, qu'une plus grande présence d'ET est observable au niveau de la portion médiale de l'artère mammaire⁵³⁹. Aucune évidence directe n'a été confirmée concernant ces données et les changements de la structure vasculaire généralement observée dans les formes sévères d'hypertension artérielle. Néanmoins, il peut être proposé que cette augmentation d'ET, à l'intérieur de la paroi de ces artères de résistance, contribue au remodelage vasculaire hypertrophique. Les résultats obtenus à l'intérieur de cette thèse démontrent clairement le rôle indispensable de l'ET dans l'induction du remodelage vasculaire hypertrophique reliée à l'influence neurohumorale dans les artères de résistances. Il est donc spéculatif, mais possible, que la synthèse accrue d'ET dans les artères de résistance, des patients atteints d'hypertension artérielle sévère, ne soit pas uniquement associée aux facteurs hémodynamiques, mais aussi à une influence neurohumorale. Ainsi, il s'avère important d'évaluer au niveau tissulaire le contenu en ET, car en dépit de l'action locale que ce peptide possède, ceci constitue le meilleur outil afin d'identifier son rôle dans le développement du remodelage vasculaire hypertrophique chez les patients hypertendus.

5.6.2 Remodelage des artères de résistance et hypertension rénovasculaire

L'hypertension rénovasculaire est généralement associée à une forme sévère d'hypertension⁸⁴. L'hyperactivité du SRA est à la base du développement de ce type d'hypertension secondaire et les conséquences de cette activation s'expriment au-delà de l'élévation de la pression artérielle⁵⁴⁰. Contrairement aux observations effectuées en présence d'hypertension essentielle, les patients atteints de cette condition présentent un remodelage vasculaire hypertrophique des petites artères sous-cutanées^{336, 337}. Il est bien caractérisé que cette forme d'hypertension secondaire est reliée à des modifications très importantes d'un point de vue neurohumoral. L'hyperactivité du SRA implique une augmentation de l'Ang II mais aussi une plus grande synthèse d'aldostérone, et de

catécholamines^{337, 540}. Ainsi, en accord avec les observations rapportées à l'aide de modèles animaux¹⁹, l'activation de facteurs neurohumoraux doit assurément contribuer au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance dans cette situation clinique. Bien que les mécanismes pouvant expliquer la mise en place des changements de la structure de ces artères de résistance demeurent encore mal compris, il est fort plausible que via l'hyperactivité du SRA, l'expression de l'ET soit augmentée dans la paroi de ces petites artères. Afin d'appuyer cette spéculation, il a déjà été établi chez des patients atteints d'hypertension artérielle sévère qu'une plus grande concentration d'ET est localisée dans la paroi de ce type d'artères²³⁷. Or, expérimentalement, il a été rapporté par plusieurs¹⁹ et par les résultats de cette thèse que l'activation de l'ET est associée au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact d'une intervention pharmacologique impliquant l'administration d'un antagoniste des récepteurs à l'ET chez ce type de patients hypertendus où un remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance contribue au développement de cet état pathologique.

À la lumière des données obtenues à l'intérieur de ma formation doctorale et par des membres de notre équipe de recherche, l'ET possède un rôle central dans le développement de l'hypertrophie de la paroi des artères de résistance²⁸². Le rôle précoce de l'ET n'a jamais été évalué dans les artères de résistance des patients hypertendus. Or, un échec à l'égard du blocage du système de l'ET ne voudrait pas signifier que l'interaction Ang - ET ne soit pas importante au remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance chez les patients atteints d'hypertension rénovasculaire. Encore faut-il que l'ET soit induit significativement à l'intérieur de la paroi vasculaire lorsque l'antagoniste des récepteurs à l'ET est administré. Le moment de l'administration constitue donc, à l'égard du développement physiopathologique, un aspect majeur au succès de ces antagonistes. Ainsi, une intervention précoce chez les patients atteints d'une hyperactivité du SRA, à l'aide d'un antagoniste des récepteurs à l'ET, préserverait la structure de ces artères et limiterait les chances de développement d'événements cardiovasculaires. D'ailleurs, il est rapporté que le remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance est encore plus important chez les patients qui

présentent un remodelage hypertrophique cardiaque³³⁶. Conséquemment, le blocage de l'axe Ang II - ET pourrait, au-delà du contrôle de la pression artérielle, prévenir les altérations de la structure artérielle et assurer un maintien de la réserve coronaire qui constitue un facteur important au bon fonctionnement cardiaque.

5.6.3 Obésité et importance de l'interaction angiotensine II – endothéline

À ce jour, l'obésité constitue un problème de santé majeur qui affecte les sociétés occidentales⁵⁴¹. L'obésité constitue un désordre métabolique chronique auquel le risque de développement d'hypertension artérielle, d'athérosclérose et de dommages de la structure rénale est amplifié⁹⁴. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de ces altérations associées à l'obésité demeurent complexes et incertains. Toutefois, des évidences expérimentales et cliniques permettent de proposer un rôle au SRA, à l'ET et aux interactions s'établissant entre ces deux facteurs dans le développement des pathologies cardiovasculaires reliées à l'obésité.

Le SRA qui constitue une composante importante au développement des maladies cardiovasculaires a aussi été localisé au niveau des cellules adipeuses des patients obèses. Ainsi, la régulation de l'activité et l'expression de divers gènes associés au SRA sont bien observées dans le tissu adipeux⁵⁴². Démontrant l'importance du SRA chez les patients atteints d'obésité, une augmentation significative de l'activité de la rénine plasmatique est rapportée chez ces derniers⁵⁴³. Par ailleurs, lors d'une diminution de poids et d'une perte significative de tissu adipeux viscéral, l'activité de la rénine plasmatique ainsi que les facteurs de risques associés aux problèmes coronariens chutent significativement. Sans qu'une relation directe soit établie entre ces deux aspects, il semble plausible que la diminution du risque d'événement coronarien soit reliée à une chute de l'activité du SRA.

Dans un modèle expérimental chez la souris, il est possible d'induire une obésité à l'aide d'une diète riche en lipides⁵⁴⁴. Une augmentation significative de l'expression du gène et

de la protéine de l'ET est alors observée dans le système cardiovasculaire⁵⁴⁴. Ceci implique le territoire vasculaire et le rein. Chez l'humain, il demeure encore difficile d'identifier l'ET comme un facteur prépondérant au développement de pathologies cardiovasculaires associées à l'obésité. Toutefois, il semble y avoir une prédisposition génétique chez certains individus pour l'obésité, de sorte qu'ils deviennent plus à risque de développer un problème vasculaire. Ainsi, les sujets obèses possèdent un taux plasmatique d'ET augmenté⁵⁴⁵. De plus, ils sont généralement hypertendus et une mutation du gène de la prepro-ET est démontrée chez ces derniers⁵⁴⁵. Ce polymorphisme génétique pourrait donc avoir une incidence dans le développement de l'hypertension artérielle chez les individus obèses. D'ailleurs, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A induit un effet vasodilatateur significatif chez les patients hypertendus présentant un embonpoint ou une obésité contrairement aux patients hypertendus présentant un poids normal⁵⁴⁶. Cette amélioration hémodynamique chez les patients obèses pourrait être associée à une plus grande production d'ET. Bien que ce ne soit pas au niveau d'artères de résistance, il est démontré à l'intérieur d'une étude expérimentale chez la souris que l'expression de la prepro-ET est augmentée significativement dans l'artère carotidienne en présence d'obésité⁵⁴⁷.

Les mécanismes pouvant expliquer le plus grand risque de développement de problèmes cardiovasculaires avec l'obésité demeurent nébuleux. Toutefois, le SRA et l'ET qui sont significativement augmentés dans cette condition pourraient contribuer à l'état cardiovasculaire des sujets obèses. De plus, à la suite des résultats obtenus à l'intérieur de cette thèse, appuyant l'idée que l'ET possède un rôle central à l'action du SRA dans le remodelage des artères de résistance, certaines études suggèrent que des interactions distinctes s'établissent entre le SRA et l'ET en présence d'obésité. La contraction à l'Ang II, d'anneau aortique provenant de souris obèses est supérieure en comparaison à celle obtenue chez des souris contrôles⁵⁴⁴. De plus, cet effet est inhibé suite à l'administration d'un antagoniste ET_A, suggérant un rôle indispensable de l'ET dans l'action vasoconstrictrice de l'Ang II. Il semble aussi qu'une interaction entre le SRA et l'ET s'établit au niveau rénal. Bien que l'activité de l'ECA n'ait jamais été évaluée chez les sujets obèses, une étude a démontré chez la souris obèse que l'activité de l'ECA

devient plus importante au niveau rénal⁵⁴⁴. Cette activation est spécifique à cet organe, car aucun changement n'a pu être démontré au niveau pulmonaire où l'ACE est généralement très exprimé. De plus, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A prévient l'activation de l'ECA localisée au rein indépendamment de la pression artérielle⁵⁴⁴. Cette modulation se doit d'être post-traductionnelle, car l'expression de l'ARNm de l'ECA n'est pas différente entre les souris obèses et celles qui ont reçu l'antagoniste du récepteur ET_A. À la lumière de ces résultats, il est difficile d'évaluer la portée physiopathologique de ces interactions, toutefois il semble plausible de spéculer que l'administration d'un antagoniste ET_A protégerait les organes du système cardiovasculaire en présence de cette condition. Des travaux supplémentaires doivent donc être poursuivis dans cette optique.

Ces observations expérimentales et cliniques indiquent clairement une activation de l'Ang II et de l'ET en présence d'obésité dans le tissu adipeux, de même que dans les organes impliqués dans le système cardiovasculaire. De plus, il semble que des interactions spécifiques existent entre ces deux facteurs. En assurant que l'interaction Ang II - ET contribue aux dommages des organes cibles, possiblement via le remodelage vasculaire hypertrophique, une meilleure compréhension de ces interactions chez les patients obèses pourrait s'avérer bénéfique afin de mieux protéger les organes cibles lors du développement de problèmes cardiovasculaires associés à cette condition.

5.6.4 Blocage du système rénine angiotensine et amélioration de la fonction des artères de résistance chez les transplantés rénaux : Rôle de l'endothéline ?

Suite à une transplantation rénale, l'incidence de développement d'hypertension artérielle est très élevée⁵⁴⁸. Bien que son développement physiopathologique soit mal compris, l'hypertension artérielle observée chez ces patients est grandement associée à l'administration de cyclosporine, un traitement immunopharmacologique qui prévient le rejet de la greffe rénale. Il est suggéré que l'action de la cyclosporine implique une plus

grande activation du SRA⁵⁴⁹. De plus, une concentration accrue d'ET plasmatique est observée chez les patients transplantés²³¹. Ainsi, l'activation de l'interaction Ang – ET pourrait contribuer aux dommages vasculaires ainsi qu'aux dommages des organes cibles associés au développement physiopathologique de ces patients.

En ce sens, une amélioration de la fonction endothéliale des patients transplantés rénaux est observée suite à un blocage du SRA⁵⁴⁸. Bien que l'administration de bloqueurs des canaux calciques puisse être considérée comme une intervention bénéfique afin de protéger la fonction endothéliale de ces patients³⁶³, il semble que l'effet associé à cette intervention pharmacologique soit moins importante que celle rapportée suite au blocage du SRA. Par ailleurs, l'administration d'un IECA atténue la concentration plasmatique en ET et une relation inverse semble exister entre l'amélioration de la fonction endothéliale et la concentration plasmatique en ET⁵⁴⁸. Ainsi, suite au blocage du SRA, la fonction endothéliale, généralement altérée, semble être améliorée et ceci implique l'ET. À la suite des résultats obtenus à l'intérieur de cette thèse, suggérant que l'Ang II induit l'expression de la prepro-ET au niveau vasculaire, une diminution de l'ET plasmatique suite au blocage du SRA est observée chez ces patients traités à la cyclosporine. En présence d'une dysfonction endothéliale, la production accrue d'ET atteint le compartiment vasculaire, spécialement lorsque l'endothélium est endommagé²³¹. L'interaction Ang – ET contribuerait donc à la dysfonction endothéliale observée chez ces patients et accentuerait le risque de développement de pathologies cardiovasculaires³⁶³. Cependant, au-delà de la dysfonction endothéliale, aucune information a permis d'évaluer le contenu vasculaire en ET et les changements de la structure des petites artères de résistance de ces patients. Au moment où cette thèse a été écrite, aucune preuve expérimentale n'a été publiée concernant l'interaction Ang II - ET et les changements de la structure des petites artères de résistances chez des patients transplantés rénaux. Sachant que ces patients présentent un plus grand risque de développement de maladies cardiovasculaires⁵⁵⁰, il serait donc pertinent d'évaluer à ce niveau l'importance de cette interaction et le rôle de l'ET.

5.7 BLOCAGE MIXTE, ENDOTHÉLINE - ANGIOTENSINE II ET PERSPECTIVES FUTURES

Le remodelage vasculaire hypertrophique correspond à un processus adaptatif plutôt qu'à un événement primaire du développement physiopathologique associé à l'hypertension artérielle. Cette adaptation de la structure vasculaire et spécialement la structure des artères de résistance pourrait contribuer au maintien de l'hypertension artérielle. Jusqu'à ce jour, aucune évidence ne permet d'appuyer cette hypothèse qui demeure une source de débat⁵⁵¹. Néanmoins, le remodelage vasculaire altère la capacité de perfusion artérielle, ce qui contribue aux dommages des organes cibles, tel le cœur, le rein et le cerveau⁵⁵¹. Ainsi, chez des patients hypertendus, une relation directe semble exister entre le remodelage vasculaire des artères de résistance et la réserve coronaire⁸ de même qu'avec l'hypertrophie ventriculaire cardiaque³³⁶. Ainsi, l'augmentation du rapport média/lumière des artères de résistance semble amplifiée lorsque les patients présentent un remodelage cardiaque hypertrophique dilaté³³⁶. Cette observation représente un pronostic néfaste qui est associé à l'apparition d'événements cardiovasculaires⁵⁵². L'administration d'un traitement pharmacologique relié à un blocage de l'ECA améliore la réserve coronaire et diminue les altérations de la structure des petites artères de résistance des patients hypertendus⁵⁵³. De plus, contrairement aux β -bloqueurs, les interventions pharmacologiques associées à un blocage du SRA démontrent, au-delà du contrôle de la pression artérielle, une protection supplémentaire qui est associée à un risque moins élevé d'apparitions d'événements cardiovasculaires¹¹. Ainsi, sachant que le SRA est directement impliqué dans le remodelage vasculaire hypertrophique, il semble plausible qu'un blocage à ce niveau prévienne le dommage des organes cibles, spécialement du myocarde. Conséquemment, peut-on croire que l'ajout d'une inhibition du récepteur ET_A induirait un effet supplémentaire à l'action induite par le blocage du SRA ?

À l'intérieur de cette thèse, le rôle central de l'ET à l'action de l'Ang II a été étudié. Indépendamment de l'élévation de la pression artérielle, une induction de l'ET par l'Ang II est observée et cela semble essentiel pour l'établissement de l'hypertrophie de la paroi

des artères de résistance. Considérant ce résultat, il paraît illogique de combiner un antagoniste du récepteur ET_A au blocage du SRA, ces deux antagonistes agissant sur la même cascade d'interactions. De plus, les observations rapportées à la suite d'un blocage du SRA démontrent une altération du contenu plasmatique en $ET^{554, 555}$. En revanche, il existe des résultats, obtenus à la suite d'études expérimentales et cliniques qui suggèrent un bénéfice à l'intervention combinée impliquant ces deux antagonistes.

Chez des rats transgéniques (mRen-2)²⁷ où une production endogène d'Ang II est impliquée dans le développement physiopathologique de ce modèle d'hypertension, il est observé que la baisse de pression artérielle associée à un antagoniste AT_1 et à un antagoniste ET_A est cumulée lorsque ces traitements sont administrés ensemble²⁷⁴. En présence de modèles expérimentaux où l'hypertension induite ne découle pas d'une hyperactivité du SRA, des résultats similaires peuvent aussi être démontrés. Chez des rats SHR et SHR-SP, un effet additif hypotenseur est présent lorsque l'antagoniste du récepteur AT_1 et l'antagoniste du récepteur ET_A sont appliqués ensemble⁵⁵⁶. Ainsi, il semble que l'effet hypotenseur de l'antagoniste du récepteur AT_1 devient plus marquant lorsqu'un antagoniste du récepteur ET_A est aussi présent. Bien qu'il existe plusieurs agents pharmacologiques antihypertenseurs, il y a beaucoup de patients hypertendus qui présentent une résistance à l'intervention pharmacologique et ces patients ont fréquemment besoin de plusieurs médicaments. À la lumière des résultats expérimentaux présentés, l'ajout d'un antagoniste du récepteur ET_A pourrait être une avenue possible afin de diminuer la pression artérielle chez ce type de patients. D'ailleurs, l'administration de l'antagoniste ET_A est présentement en étude clinique afin d'abaisser l'hypertension artérielle de ces patients résistant au traitement déjà établi²¹².

Au-delà de leur effet hémodynamique, le blocage de ces deux systèmes limiterait le dommage aux organes cibles, soit au niveau cardiaque et rénal. Ceci semble relié à un effet indirect hémodynamique et à un effet direct de l'Ang II et de l'ET sur la structure cardiovasculaire. Expérimentalement, la combinaison du blocage du SRA et d'un antagoniste du récepteur ET_A atténue davantage le développement vers l'insuffisance cardiaque et ainsi améliore la survie dans un modèle d'hypertension artérielle associée à

une hypertrophie du ventricule gauche⁵⁵⁷. Ces résultats semblent suggérer que l'Ang II et l'ET possèdent chacun des rôles physiopathologiques distincts lors de l'établissement de l'insuffisance cardiaque. Tôt dans le développement physiopathologique, il est démontré que l'ajout d'un antagoniste ET_A prévient davantage le développement de la fibrose cardiaque dans un modèle d'infarctus du myocarde⁵⁵⁸. De plus, comparativement à la monothérapie impliquant le blocage du SRA, il est démontré à long terme que le double blocage (SRA et ET) limite de manière plus importante le développement vers l'insuffisance cardiaque suite à un infarctus du myocarde⁵⁵⁹ et améliore les fonctions hémodynamiques⁵⁶⁰. Ainsi, un bénéfice substantiel est démontré lorsque l'antagoniste ET_A est ajouté à l'antagoniste AT₁ dans cette condition. Chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive, auxquels une administration d'IECA est généralement administrée, l'ajout d'un antagoniste ET_A implique un grand bénéfice du point de vue hémodynamique, suggérant que cette combinaison serait intéressante dans le traitement de l'insuffisance cardiaque⁵⁶¹.

Le blocage conjoint du SRA et du système de l'ET a aussi été évalué à l'égard de la protection rénale. Dans un modèle d'hypertension rénovasculaire, la combinaison de ces deux agents pharmacologiques entraîne un effet hypotenseur plus important qu'en présence d'un traitement unique à l'aide d'un antagoniste AT₁⁵⁶². De plus, à l'aide d'un modèle associé à une néphropathie⁵⁶³, de même qu'en présence d'un modèle associé à une ablation partielle glomérulaire⁵⁶⁴, des bénéfices supplémentaires peuvent être observés suite à l'ajout d'un antagoniste ET_A. Ceci implique une diminution de la protéinurie et une atténuation de la sclérose glomérulaire respectivement. Dans le modèle de rat DOCA-sel, un effet antihypertenseur plus important est observé en présence de la combinaison thérapeutique⁵⁶⁵. Toutefois, aucun effet supplémentaire concernant la protection de la structure rénale n'a pu être associé à cette intervention conjointe. Finalement, en présence d'une néphrectomie partielle chez le rat, le blocage du SRA améliore la filtration glomérulaire, la protéinurie et limite les altérations de la structure rénale, toutefois le blocage conjoint avec l'antagoniste du récepteur ET_A n'implique aucun effet additionnel⁵²⁷.

En résumé, il semble plausible que l'intervention thérapeutique conjointe, impliquant le blocage du SRA et du système de l'ET amplifie l'action individuelle produite par chacune de ces interventions thérapeutiques. Un effet antihypertenseur plus important semble possible ce qui contribuerait à une meilleure cardioprotection. Néanmoins, les avantages associés à ce double blocage semblent plus incertains dans certaines pathologies rénales. De plus, à l'aide d'un modèle de souris transgénique hRen/hAgt, aucun effet hémodynamique est observé suite à l'administration individuelle de chacun des deux antagonistes⁵⁶⁶. Toutefois, le blocage unique de l'ET prévient la mortalité et le double blocage (SRA et ET) abaisse la pression artérielle. Ainsi, cette dernière intervention prévient la mortalité de manière égale à l'effet rapporté en présence d'une monothérapie impliquant le blocage unique du système de l'ET. Il s'avère donc plausible qu'un avantage, quant à la protection des organes cibles, soit associé à l'ajout d'un antagoniste du récepteur ET_A.

5.8 RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Bien que l'action du SRA est incontestable dans le développement de l'hypertension artérielle et du remodelage vasculaire hypertrophique³²⁵, la contribution de l'ET à l'action de l'Ang II est mal établie chez l'humain. Cette thèse présente des données expérimentales démontrant une hétérogénéité vasculaire à l'égard des interactions neurohumorales lors de l'établissement de l'hypertrophie de la paroi artérielle. Le rôle central de l'ET à l'action hypertrophique vasculaire de l'Ang II a bien été identifié dans le territoire formant les artères de résistance. Les mécanismes intra-cellulaires, sous-jacents à cette interaction Ang II – ET et hypertrophie de la paroi vasculaire ont été explorés et des éléments communs de la signalisation cellulaire, tel Src, le récepteur à l'EGF et ERK1/2 ont été identifiés comme des facteurs importants à l'induction de l'expression de l'ET par l'Ang II. Les résultats présentés dans cette thèse n'ont pu permettre d'élucider les événements stimulés par l'ET qui permettraient son effet hypertrophique au niveau des artères de résistance. Mais, il demeure important de poursuivre l'investigation de la signalisation cellulaire impliquée *in vivo* dans l'action de l'ET. Sachant que le rôle de ce peptide est transitoire et qu'il est nécessaire à l'initiation du remodelage vasculaire et non au maintien du processus physiopathologique, il serait fort utile d'identifier des cibles intra-cellulaires qui contribueraient au maintien du remodelage vasculaire hypertrophique des artères de résistance. Ainsi, la poursuite de ces travaux en aval de l'ET permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui feraient régresser l'action délétère associée à l'interaction Ang II – ET.

L'interaction s'établissant entre le SRA et l'ET est complexe. Toutefois, au niveau vasculaire, il semble bien clair que l'ET agit comme intermédiaire dans plusieurs effets de l'Ang II, tels la vasoconstriction, l'hypertrophie, la prolifération de tissu fibreux et la production de stress oxydatif. Ainsi, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A pourrait augmenter l'action bénéfique du blocage du SRA particulièrement au niveau vasculaire. Sachant que l'antagoniste ET_A en soi possède un effet antihypertenseur moins important et une habilité supérieure afin de limiter le dommage des organes

cibles, l'ajout de cette intervention pharmacologique s'avèrerait très intéressant dans plusieurs situations cliniques, spécialement lorsque les risques de développer des événements cardiovasculaires sont grands.

BIBLIOGRAPHIE

1. Yusuf S, Reddy S, Ôunpuu S, Anand S: Global burden of cardiovascular diseases, part I. *Circulation* 2001;104:2746-2753.
2. Yusuf S, Reddy S, Ôunpuu S, Anand S: Global burden of cardiovascular diseases, part II. *Circulation* 2001;104:2855-2864.
3. Tanuseputro P, Manuel DG, Leung M, Nguyen K, Johansen H: Risk factors for cardiovascular disease in Canada. *Can J Cardiol* 2003;19:1249-1259.
4. Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M: Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 2004;43:10-7.
5. MacMahon S, Peto R, Culter J, Collins R, sorlier P, Neaton J, al. e: Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;335 (8692):765-74.
6. Collins R, Peto R, MacMahon S, al. e: Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drugs trial in their epidemiological context. *Lancet* 1990;335(8693):827-38.
7. Perry IV. Epidemiology of Hypertension. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ, ed. *Cardiology*. London: Mosby, 2004: 1702. vol 1).
8. Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozàkovà M, La Canna G, Nardi M, Guelfi D, Salvetti M, Morizzo C, Vittone F, Rosei EA: Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J of Hypertension* 2003;21:625-631.
9. Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P: Effects of a beta-blocker or a converting enzyme inhibitor on small arteries in essential hypertension. *Hypertension* 1994;23:83-91.
10. Schiffrin EL, Pu Q, Park JB: Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2002;15:105-110.
11. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, al. e: Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995-1003.

12. Olsen MH, Wachtell K, Hermann KL, Bella JN, Andersen UB, Dige-Petersen H, Rokkedal J, Ibsen H: Maximal exercise capacity is related to cardiovascular structure in patients with longstanding hypertension. A LIFE substudy. *Am J Hypertens* 2001;14:1205-1210.
13. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
14. Lüscher TF, Dubey RK. Endothelium and platelet-derived vasoactive substance: Role in the regulation of vascular tone and growth. In: Laragh JH, Brenner BM, ed. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York: Raven Press, 1995: 609-629.
15. Lüscher TF, Noll G. The endothelium in coronary vascular control. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease*. Philadelphia: Saunders Company, 1995: 1-9. vol Update 3).
16. Lee RMKW, Owens GK, Scott-Burden T, Head RJ, Mulvany MJ, Schiffrin EL: Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:574-584.
17. Schiffrin EL: Beyond blood pressure: The endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* 2002;15:115S-122S.
18. Moreau P: Endothelin in hypertension: A role for receptor antagonists? *Cardiovascular Research* 1998;39:534-542.
19. Moreau P, Schiffrin LE: Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:511-521.
20. Lindolp GBM. The effects of hypertension on the structure of human resistance vessels. In: Swales JD, ed. *Textbook of Hypertension*. London: Blackwell Scientific Publications, 1994: 663-669.
21. Pugsley MK, Tabrizchi R: The vascular system - an overview of structure and function. *J of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000;44:333-340.
22. Kinne RKH: Endothelial and Epithelial cells: general principles of selective vectorial transport. *Int J Microcirc* 1997;17:223-230.
23. Kirkpatrick CJ, Wagner M, Hermanns I, Klein CL, Köhler H, Otto M, van Kooten TG, Bittinger F: Physiology and cell biology of the endothelium: A dynamic interface for cell communication. *Int J Microcirc* 1997;17:231-240.
24. Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suematsu M, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M: Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 1996;148:1949-1956.

25. Et-Taouil K, Safar M, Plante GE: Mechanisms and consequences of large artery rigidity. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:205-211.
26. Intengan HD, Schiffrin EL: Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension. *Hypertension* 2000;36:312-318.
27. Davis MJ, Hill MA: Signaling mechanism underlying the vascular myogenic response. *Physiological Reviews* 1999;79:387-423.
28. Parks WC, Pierce RA, Lee KA, al. e: The extracellular matrix. *Adv Mol Cell Biol* 1993;6:133-182.
29. Bézie Y, Daniel-Lamazière JM, Gabella G, Koffi I, Laurent S, Lacolley P: Déterminants matriciels de la rigidité artérielle: Importance des relations cellules-matrice. *Pathologie Biologie* 1998;47:669-676.
30. Borysenko M, Beringer T. Vascular wall. In: Functional histology. Boston: Little, Brown and Company, 1984: 195-208.
31. Gutterman DD: Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;277:H1265-H1272.
32. Tsutsui M, Onoue H, Iida Y, Smith L, O'Brien T, Katusic ZS: Adventitia-dependent relaxations of canine basilar arteries transduced with recombinant eNOS gene. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1999;45:H1846-H1852.
33. Gonzalez MC, Arribas SM, Molero F, Fernandez-Alfonso MS: Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2001;280:H2876-H2881.
34. Safar ME, Levy BI, Laurent S, London GM: Hypertension and the arterial system: Clinical and therapeutic aspects. *J of Hypertens* 1990;1998:S113-S119.
35. Scott J: Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J of Anat* 1995;187:259-269.
36. Fronek K, Fung Y: Mechanical properties of arteries as a function of topography and age. *Biorheology* 1980;17:227-234.
37. Lacolley P, Ghodsi N, Glaser E, al. e: Influence of graded changes in vasomotor tone on the carotid arterial mechanism in live spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1995;115:1235-1244.
38. Safar M. The arterial system. In: Safar M, ed. Arteries in clinical hypertension. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1994: 11-19.
39. Belz GG: Elastic properties and windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995;9:73-83.
40. Bader H: Importance of the gerontology of elastic arteries in the development of essential hypertension. *Clin Physiol Biochem* 1983;1:36-56.

41. Rhodin JAG: The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *Journal of Ultrastructure Research* 1967;18:181-190.
42. Laughlin MH, Oltman CL, Bowles DK: Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30:352-260.
43. Levick JR. Overview of the cardiovascular system. In: Levick JR, ed. *An Introduction to Cardiovascular Physiology*. London: Arnold, 2003: 1-13.
44. Kingwell BA, Sherrard B, Jennings GL, Dart AM: Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997;272:H1070-H1077.
45. Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Burke V, Taylor RR, O'Driscoll JG: Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training. *J Appl Physiol* 2004;97:749-755.
46. Mulvany MJ, Aalkjaer C: Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews* 1990;70:921-961.
47. Christensen KL, Mulvany MJ: Location of resistance arteries. *J of Vasc Res* 1999;38:1-12.
48. Heagerty AM, Izzard AS: small-artery changes in hypertension. *J of Hypertens* 1995;13:1560-1565.
49. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW: Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 1986;250:H291-H303.
50. Williams DA, Segal SS: Feed artery role in blood flow control to rat hindlimb skeletal muscles. *J of Physiol (Lond)* 1993;463:631-646.
51. Kuo L, Davis MJ, Chilian M: Endothelial modulation of arterial tone. *News Physiol Sci* 1992;7:5-9.
52. Moreau P, Lüscher TF. Hypertension. In: Rubanyi GM, Dzau VJ, ed. *The endothelium in clinical practice*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997: 331-354.
53. Kingwell BA: Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J* 2000;14:1685-1696.
54. Folkow B, Sonnenschein RR, Wright DL. Differential influences of nervous and local humoral factors on large and small precapillary vessels of skeletal muscle. In: Hudlicka O, ed. *Circulation in skeletal muscle*. New York: Pergamon Press, 1966: 165-169.
55. Franklin SS: Cardiovascular risks related to increased diastolic, systolic and pulse pressure. *Pathologie Biologie* 1999;47:594-603.

56. Black HR, Kuller LH, O'Rourke MF, Weber MA, Alderman MH, Benetos A, Burnett J, Cohn JN, Franklin SS, Mancia G, Safar M, Zanchetti A: The first report of the systolic and pulse pressure (SYPP) working group. *J of Hypertens* 1999;17:S3-S14.
57. Mayet J, Hughes A: Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart* 2003;89:1104-1109.
58. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, Brière R. Intégration de la fonction cardiovasculaire: Régulation de la pression artérielle systémique. In: Poulin M, ed. *Physiologie Humaine*. 3ième Édition ed. Montréal: Chenelière/McGraw-Hill, 1995: 426-435.
59. Franklin SS, Izzo JL. Aging, hypertension, and arterial stiffness. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 170-175.
60. Lakatta EG: Cardiovascular aging research: the next generations. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:613-25.
61. Seals DR: Habitual exercise and the age-associated decline in large artery compliance. *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:68-72.
62. Folkow B, Svanborg A: Physiology of cardiovascular aging. *Physiological Reviews* 1993;73:725-764.
63. Tanaka H, Dinunno K, Monahan C, Clevenger C, DeSouza C, Seals DR: Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 2000;102:1270-1275.
64. Mitchell GF, Izzo JL. Evaluation of arterial stiffness. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 351-355.
65. James MA, Watt PAC, Potter JF, Thurston H, Swales JD: Pulse pressure and resistance artery structure in the elderly. *Hypertension* 1995;26:301-306.
66. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetière P, Benetos A: Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001;37:1236-1241.
67. Smulyan H, Safar ME: The diastolic blood pressure in systolic hypertension. *Ann Intern Med* 2000;132:233-237.
68. Safar ME, Cloarec-Blanchard L, London GM: Arterial alterations in hypertension with a disproportionate increase in systolic over diastolic blood pressure. *J of Hypertens* 1996;14:S103-S110.
69. Safar ME: Hypothesis on isolated systolic hypertension in the elderly. *J of Hum Hypertens* 1999;13:813-815.

70. Laurent S, Kingwell BA, Bank A, Weber MA, Struiker-Boudier H: Clinical applications of arterial stiffness: Therapeutics and pharmacology. *Am J Hypertens* 2002;15:453-458.
71. Pachon V: A new approach to sphygmomanometry. *Press Med* 1913;12:229-331.
72. Strandberg TE, Pitkala K: What is the most important component of blood pressure: systolic, diastolic or pulse pressure? *J of Hypertens* 2003;12:293-297.
73. Kannel WB: Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 2000;85:251-255.
74. Shekelle RB, Ostfeld AM, Klawans HL: Hypertension and risk of stroke in an elderly population. *Stroke* 1974;5:71-75.
75. Liu L, Wang JG, Gong L, al. e: Comparison of active treatment and placebo in older Chinese patients with isolated systolic hypertension. *J of Hypertens* 1998;16:1823-1829.
76. Franklin SS, Larson MG, Shehzad AK, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, Levy D: Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? *Circulation* 2001;103:1245-1249.
77. Miura K, Dyer AR, Greenland P, Davignus ML, Hill MA, Liu K, Garside DB, Stamler J: Pulse pressure compared with other blood pressure indexes in the prediction of 25-year cardiovascular and all-cause mortality rates. *Hypertension* 2001;38:232-237.
78. Franklin SS, Wong ND, Larson MG, Kannel WB, Levy D: How important is pulse pressure as a predictor of cardiovascular risk? *Hypertension* 2002;39:E12-13.
79. Sesso HD, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Gaziano JM, Manson JE, Glynn RJ: systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of cardiovascular disease risk in men. *Hypertension* 2000;36:801-807.
80. Dustin HP: Isolated systolic hypertension: A long-neglected cause of cardiovascular complications. *Am J Med* 1989;86:368-369.
81. Glynn RJ, L'Italien GJ, Sesso HD, Jackson EA, Burning JE: Development of predictive models for long-term cardiovascular risk associated with systolic and diastolic blood pressure. *Hypertension* 2002;39:105-110.
82. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'Italien GJ, Fodor G: Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and United States. *Am J Hypertens* 2001;14:1099-1105.
83. Languile DB, Joffres MR, MacPherson KM, Andreou P, Kirkland SA, MacLean DR: Prevalence of risk factors for cardiovascular disease in Canadians 55 to 74

years of age: results from the Canadian Heart Health Surveys, 1986-1992. *Can Med Assoc J* 1999;161:S3-S9.

84. d'hypertension Sc. Définition et classification de l'hypertension. In: Drouin D, Milot D, ed. Guide thérapeutique de l'hypertension. Québec: 2002: 9-10.
85. Delgado C, Weder AB. Pathophysiology of hypertension. In: Oparil S, Weber MA, ed. Hypertension. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1999: 21-42.
86. Watson RE, DiPette DJ. Experimental models of hypertension. In: Izzo JL, Black HR, ed. Hypertension Primer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 120-122.
87. Wenzel RR, Bruck H, Noll G, Schäfers RF, Daul AE, Philipp T: Antihypertensive drugs and the sympathetic nervous system. *J of Cardiovas Pharmacol* 2000;35:S43-S52.
88. Jackson EK, Garrison JC. Renin and angiotensin. In: Hardman JG, Limbird LE, ed. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1996: 733-758.
89. Phillips MI, Speakman EA, Kiumura B: Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 1993;43:1-20.
90. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI: Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension* 1997;30:535-541.
91. Touyz Rm, Schiffrin EL: Signal transduction mechanisms mediating the physiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews* 2000;52:639-672.
92. Timmermanns PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JM, Smith RD: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews* 1993;45:205-251.
93. Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA: Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 1998;32:387- 392.
94. Barton M, Carmona R, Ortmann J, Krieger JE, Traupe T: Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. *Int J of Biochem & Cell Biol* 2003;35:826-837.
95. Saris JJ, van Dijk MA, Kroon I, Schalekamp MA, Danser AH: Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension* 2000;35.
96. Lavoie JL: Minireview: Overview of the renin-angiotensin system - an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003;144:2179-2183.

97. Grise C, Boucher R, Thibault G, Genest J: Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem* 1981;59:250-255.
98. Boucher R, Demassieux S, Garcia R, Genest J: Tonin, angiotensin II system. A review. *Circ Res* 1977;41:26-29.
99. Miserey S, Clauser E: Récepteurs de l'angiotensine II: classification, structure et transduction du signal. *Thérapie* 1998;53:205-211.
100. Chaki S, Inagami T: Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:388-394.
101. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KI, Miller-Wing AV, Cook VI, Harding ECE, Harding JW: Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 1992;40:409-419.
102. Masatsugu H, Masahiro A, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-621.
103. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn F: Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 2000;13:31S-38S.
104. Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD: Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J of Physiol Heart Circ* 1994;267:E260-E267.
105. Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P: Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes: an in situ hybridization study. *Hypertension* 1994;24:531-537.
106. Yamada H, Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Regulation of vascular development and differentiation by angiotensin II type 2 receptor. *Hypertension* 1997;30:470.
107. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-621.
108. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Mitsuru O, Mendelsohn AO: Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2, and AT4 receptors. *J of Hypertens* 1998;16:2027-2037.
109. Unger T: The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J of Hypertens* 1999;17:1775-1786.
110. Goodfriend TL. Angiotensins: Actions and receptors. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2003: 8-11.

111. Siragy HM: The role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:62S-67S.
112. Dzau VJ: Short- and Long- Term determinants of cardiovascular functions and therapy: contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems. *J of Cardiovas Pharmacol* 1989;14:S1-S5.
113. Dzau VJ, Braunwald E: resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J* 1991;121:1244-1263.
114. Cheung BM: Blockade of the renin-angiotensin system. *Hong Kong Medical Journal* 2002;8:185-191.
115. Unger T: Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J of Hypertens* 2003;21:S3-S7.
116. Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, al. e: Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish trial in old patients with hypertension-2 study. *Lancet* 1999;354:1751-1756.
117. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, al. e: Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the captopril prevention project (CAPP) randomised trial. *Lancet* 1999;353:611-616.
118. Mooser V, Nussberger J, Juillerat L, Burnier M, Waeber B, bidiville J, Pauly N, Brunner HR: Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. *J of Cardiovasc Pharmacol* 1990;15:276-282.
119. Tschöpe C, Schultheiss HP, Walther T: Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J of Cardiovas Pharmacol* 2002;39:478-487.
120. Israelli ZH, Hall WD: Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitors therapy: a review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med* 1992;117:234-242.
121. Unger T: Neurohormonal modulation in cardiovascular disease. *Am Heart J* 2000;139:S2-S8.
122. Hernandez-Hernandez R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernandez MJ, Armas-Padilla MC, Cammarata R: Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 2002;16:S93-S99.
123. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L: Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J of Hypertension* 1993;11:S13-S18.

124. Molinaro G, Rouleau JL, Adam A: Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:131-141.
125. Worthley M, Corti R, Worthley SG: Vasopeptidase inhibitors: will they have a role in clinical practice. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2003;57:27-36.
126. Weber MA: Vasopeptidase inhibitors. *Lancet* 2001;358:1525-1532.
127. Stanton A: Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:389-394.
128. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR: Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor aliskiren (SPP100). *Hypertension* 2002;39:e1-e8.
129. Izzo JL. Sympathetic nervous system in acute and chronic blood pressure elevation. In: Oparil S, Weber MA, ed. *Hypertension: A companion to Brenner and Rector's The kidney*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000: 42-58.
130. Abboud FM: The sympathetic system in hypertension. *Hypertension* 1982;4:208-225.
131. Guyton AC, Hall JE. Nervous regulation of the circulation, and rapid control of arterial pressure. In: Guyton AC, Hall JE, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: 209-220.
132. Flatmark T: Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* 2000;168:1-17.
133. Guyton AC, Hall JE. The autonomic nervous system; the adrenal medulla. In: Guyton AC, Hall JE, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996: 769-781.
134. Granner DK. Hormones of the adrenal medulla. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed. *Harper's Biochemistry*. Norwalk: Appleton&Lange, 1993: 536-541.
135. Augustine GJ: How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:320-326.
136. Augustine GJ, Burns ME, DeBello WM, Hilfiker S, Morgan JR, Schweizer FE, Tokumaru H, Umayahara K: Proteins involved in synaptic vesicle trafficking. *J of Physiol* 1999;520:33-41.
137. Hoffman BB, Lefkowitz RJ, Taylor P. Neurotransmission. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, ed. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996: 105-139.
138. Guimaraes S, Moura D: Vascular adrenoreceptors: An update. *Pharmacological reviews* 2001;53:319-356.

139. Docherty JR: Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 198;361:1-15.
140. Brede M, Nacgy G, Philipp M, Sorensen JB, Lohse MJ, Hein L: Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:1640-1646.
141. Vanhoutte P, Miller V: Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med* 1989;87:1S-4S.
142. Lands AM, Arnold A, Mcauliff JP, Luduena FP, Brown TG: Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967;214:597-598.
143. Floras JS: Epinephrine and the genesis of hypertension. *Hypertension* 1992;19:1-18.
144. Langer SA: Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological reviews* 1981;32:337-362.
145. de Champlain J: Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J of Hypertens* 1990;8:S77-S85.
146. de Champlain J, Karas M, Toal CB, Nadeau R, Larochelle P: Effects of antihypertensive therapies on the sympathetic nervous system. *Can J Cardiol* 1999;15:8A-14A.
147. Esler M, Jennings GL, Korner P, al. e: Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurement of norepinephrine turnover. *Hypertension* 1988;11:3-20.
148. de Champlain J, Krakoff LR, Axelrod J: Catecholamine metabolism in experimental hypertension in the rat. *Circ Res* 1967;20:136-145.
149. de Champlain J. Hypertension and the sympathetic nervous system. In: Snyder SH, ed. *Perspectives in neuropharmacology: a tribute to Julius Axelrod*. Oxford: Oxford University Press, 1972: 215-265.
150. de Champlain J, Bouvier M, Drolet G: Abnormal regulation of the sympathoadrenal system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:1605-1614.
151. Tsuda K, Kughi M, Nishio I, Masuyama Y: Presynaptic alpha2-adrenoceptor mediated regulation of norepinephrine release in perfused mesenteric vasculature in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ* 1987;51:25-32.
152. Bouvier M, de Champlain J: Selective activation of the adrenal medulla during acute bilateral carotid occlusion and its modulation by alpha-adrenergic receptor in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1983;61:381-387.

153. de Champlain J, Cousineau D, Lapointe L: Evidence supporting an increased sympathetic tone and reactivity in subgroup of patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1980;2:359-377.
154. de Champlain J: Do most antihypertensive agents have a sympatholytic action? *Curr Hypertens Rep* 2001;3:305-313.
155. Longhurst PA, Rice PJ, Taylor DA, Fleming WW: Sensitivity of caudal arteries and the mesenteric vascular bed to norepinephrine in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 1988;12:133-142.
156. Philipp TH, Distler A, Cordes U: Sympathetic nervous system and blood pressure control in essential hypertension. *Lancet* 1978;ii:959-963.
157. Feldman RD: Beta-adrenergic receptor alteration in hypertension: physiological and molecular correlates. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;64:1666-1672.
158. Masuyama Y, Fukuda K: Adrenoceptors in experimental hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1989;11:31-42.
159. Limas CJ, Limas C: Reduced number of beta-adrenergic receptors in the myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83:710-714.
160. Durkin H, Ollerenshaw JD, Heagerty AM: Resistance artery phosphoinositide metabolism in genetic hypertension. *J of Hypertens* 1990;8:557-563.
161. Davis BR, al. e: Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone (ALLHAT). *JAMA* 2000;283:1967-1975.
162. Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine J-P. Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Rubanyi GM, Dzau VJ, ed. *The endothelium in clinical practice*. New York: Marcel Decker Inc., 1997: 265-289.
163. Vanhoutte PM: Say NO to ET. *J of the Autonomic Nervous System* 2000;81:271-277.
164. Vanhoutte PM: Endothelial control of vasomotor function - From health to coronary disease -. *Circulation Journal* 2003;67:572-575.
165. Schiffrin EL: A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J of Cardiovas Pharmacol* 2001;38:S3-S6.
166. Alderton W, Cooper CE, Knowles RG: Nitric Oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
167. Alarcon LH, Billiar TR, Simmons RL. Nitric oxide, sepsis and the heart. In: Lewis MJ, Shah AM, ed. *Endothelial modulation of cardiac function*. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers, 1997: 71-90.

168. Galley HF, Webster NR: Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia* 2004;93:105-113.
169. Deng LY, Li JS, Schiffrin EL: Endothelium-dependent relaxations of small arteries from essential hypertensive patients. Mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1995;88:611-622.
170. Ahlborg G, Lundberg JM: Nitric oxide - endothelin-1 interactions in humans. *J Appl Physiol* 1997;82:1593-1600.
171. Kelly LK, Wedgwood S, Steinhorn RH, Black SM: Nitric oxide decreases endothelin-1 secretion through the activation of soluble guanylate cyclase. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2004;286:L984-L991.
172. Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-2018.
173. Vanhoutte P: State of the Art Lecture: Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989;13:658-667.
174. Sarkar R, Webb RC: Does nitric oxide regulated smooth muscle cell proliferation? *J Vas Res* 1998;35:135-142.
175. Sys SU, Mohan P, Andies LJ, De Keulenaer G, Fransen PF, Brutsaert DL. Endocardial endothelial modulation of myocardial contraction. In: Lewis MJ, Shah AM, ed. *Endothelial modulation of cardiac function*. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers, 1997: 1-18.
176. Hecker M, Foegh ML, Ramwell PW. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes & related compounds. In: Katzung BG, ed. *Basic & Clinical Pharmacology*. Norwalk: Appleton & Lange, 1995: 290-304.
177. Hintze TH, Kaley G: Prostaglandins and the control of blood flow in the canine myocardium. *Circ Res* 1977;40:313-320.
178. Vanhoutte PM: How to assess endothelial function in human blood vessels. *J of Hypertension* 1999;17:1047-1058.
179. Vanhoutte PM: Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological research* 2004;49:503-508.
180. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, Brière R. Le muscle lisse. In: Poulin M, ed. *Physiologie humaine*. Montréal: Chenelière/McGraw-Hill, 1995: 320-328.
181. Cohen RA, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995;92:3337-3349.
182. Beny JL, Brunet PC: Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. *J of Physiol* 1988;398:277-289.

183. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA. Endothelium-dependent hyperpolarization in the human coronary artery. In: Vanhoutte PM, ed. Endothelium-derived hyperpolarization factor. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers, 1996: 278-287.
184. Griffith TM: Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *British Journal of Pharmacology* 2004;141:881-903.
185. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000;106:1521-1530.
186. White R, Hiley CR: A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1997;122:1573-1584.
187. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH: K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998;396:269-272.
188. Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM: Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the arterial tree of the rat. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1992;263:90-94.
189. Archer SLM, Gragasin FSB, Wu XP, Wang SM, McMurtry SM, Kim DHM: Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activity smooth muscle BKCa channels. *Circulation* 2003;107:769-776.
190. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A: Endothelial dysfunction in hypertension. *J of Cardiovas Pharmacol* 2001;38:S11-S14.
191. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS: Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986;48:307-320.
192. Vanhoutte PM: The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993;87:V-9-V17.
193. Lüscher TF, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1986;8:344-348.
194. Davidge ST: Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001;89:650-660.
195. Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM: Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human renin and human angiotensinogen. *Stroke* 2000;31:760-764.

196. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti M: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-933.
197. Huang A, Sun D, Koller A: Shear stress-induced release of prostaglandin H₂ in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:925-930.
198. Diederich D, Yang ZH, Buhler FR, Luscher TF: Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. *Am J Physio (Heart Circ Physiol)* 1990;258:H445-H451.
199. Fu-Xiang D, Jameson M, Skopec J, Diederich A: Endothelial dysfunction of resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1992;20:S190-S192.
200. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, al. e: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
201. Goto K. Endothelin: From basic to pathophysiology research. In: Rubanyi GM, Dzau VJ, ed. *The Endothelium in Clinical Practice*. New York: Marcel Dekker Inc, 1997: 125-148.
202. Rubanyi GM, Polokoff MA: Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological reviews* 1994;46:325-415.
203. Turner AJ, Murphy LJ: Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochemical Pharmacology* 1996;51:91-102.
204. Wagner OF, Christ G, Wojta J, al. e: Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:16066-16068.
205. Dupuis J: Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics. *Can J Cardiol* 2000;16:903-910.
206. Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS: Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994;77:1451-1459.
207. Miyauchi T, Masaki T: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999;61:391-415.
208. Kuchan MJ, Frangos JA: Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physio (Heart Circ Physiol)* 1993;264:H150-H156.
209. Moreau P, Nava E, Takase H, Luscher TF. Local regulation of vascular function: Focus on endothelium-dependent mechanisms in normotension, hypertension and atherosclerosis. In: Zanchetti A, Mancia G, ed. *Pathophysiology of hypertension*. Amsterdam: Elsevier, 1997: 975-1006.

210. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A: Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: Exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996;81:1510-1515.
211. Doggrell SA: The therapeutic potential of endothelin-1 receptor antagonists and endothelin-converting enzyme inhibitors on the cardiovascular system. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1537-1552.
212. Kirchengast M, Luz M: Endothelin receptor antagonists. *J of Cardiovas Pharmacol* 2005;45:182-191.
213. Chua BH, Krebs CJ, Chua CC, Diglio CA: Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992;262:E412- E416.
214. Grainger DJ, Witchell CM, Weisberg PL, Metcalfe JC: Mitogens for adult rat aortic vascular smooth muscle cells in serum-free primary culture. *Cardiovasc Res* 1994;28:1238-1242.
215. Diep QN, Intengan HD, Schiffrin EL: Endothelin-1 attenuates omega3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase 3. *Hypertension* 2000;35:287-291.
216. Kurihara H, Kurihara Y, Nagai R, Yazaki Y: Endothelin and neural crest development. *Cell Mol Biol* 1999;45:639-651.
217. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, al. e: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994;368:703-710.
218. MacLean MR, Randall MD, Hiley CR: Effects of moderate hypoxia, hypercapnia and acidosis on hemodynamic changes induced by endothelin-1 in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1989;98:1055-1065.
219. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Irukayama-Tomobe Y, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M: Involvement of endogenous endothelin-1 in exercise-induced redistribution of tissue blood flow: an endothelin receptor antagonist reduces the redistribution. *Circulation* 2002;106:2188-2193.
220. Wenzel RR, Czyborra P, Luscher TF, Philipp T: Endothelin in cardiovascular control: The role of endothelin antagonists. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:79-87.
221. d'Uscio LV, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF: Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997;29:435-441.
222. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1988;255:H970-H973.
223. Hom GJ, Touhey B, Rubanyi GM: Effects of intracoronary administration in anesthetized dogs: comparison with Bay k 8644 and U 46619. *J of Cardiovas Pharmacol* 1992;19:194-200.

224. Shubeita HE, McDough PM, Harris AN, al. e: Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1990;265:20555-20562.
225. Abassi ZA, Ellahham S, Winaver J, Hoffman A: The intrarenal endothelin system and hypertension. *News Physiol Sci* 2001;16:152-156.
226. Burnett J. Endothelin in hypertension. In: Oparil S, Weber MA, ed. Hypertension: A companion to Brenner and Rector's the kidney. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996: 152-158.
227. Kato K, Sawada S, Toyoda T, Kobayashi T, Shirai K, Yamamoto K, Tamagaki T, Yamagami M, Yoneda M, Takada O, al. E: Influence of endothelin on human platelet aggregation and prostacyclin generation from human vascular endothelial cells in culture. *Jpn Circ* 1992;56:422-431.
228. Krum H, Liew D: Current status of endothelin blockade for the treatment of cardiovascular and pulmonary vascular disease. *Curr Opinion in Investigational Drugs* 2003;4:298-302.
229. Luscher TF, Barton M: Endothelins and endothelin receptor antagonists. *Circulation* 2000;102:2434-2440.
230. Schiffrin EL: Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 1999;34:876-881.
231. Touyz RM, Schiffrin EL: Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:533-541.
232. Webb DJ, Monge JC, Rabelink TJ, Yanagisawa M: Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:5-8.
233. Ohuchi T, Kuwaki T, G.Y. L, al. e: Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol* 1999;276:R1071-R1077.
234. Gariepy CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M: Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest* 2000;105:925-933.
235. Clozel M, Breu V: The role of ETB receptors in normotensive and hypertensive rats as revealed by the non-peptide selective ETB receptor antagonist. *FEBS Lett* 1996;383:42-45.
236. Dao HH, Moreau P: An update on the status of endothelin receptor antagonists for hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1937-1946.
237. Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, Day R: Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe essential hypertension. *J of Hypertens* 1997;15:57-63.

238. Krum H, Viskoper RJ, Lacoursière Y, al. e: The effects of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:784-790.
239. Nakov R, Pfarr E, Eberle S: Darusentan: an effective endothelin A receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15:583-589.
240. Matsumura Y, Hisaki K, Takaoka M, Morimoto S: Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big-endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 1990;185:103-106.
241. Abassi ZA, Golomb E, Keiser HR: Neutral endopeptidase inhibition increases the urinary excretion and plasma levels of endothelin. *Metabolism* 1992;41:683-685.
242. Laflamme AK: Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine. *Thérapie* 1998;53:245-252.
243. Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, al. e: Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:584-592.
244. Brasch H, Sieroslawski L, Dominiak P: angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension* 1993;22:699-704.
245. Wong PC, Bernard R, Timmermans PB: Effect of blocking angiotensin II receptor subtype on rat sympathetic nerve function. *Hypertension* 1992;6.
246. Moreau N, Richer C, Vincent MP, Guidicelli JF: Sympathoinhibitory effects of losartan in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1993;22:126-134.
247. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Duranti P, Favilla S, Salvetti A: Vascular renin-angiotensin system and sympathetic nervous system activity in human hypertension. *J of Cardiovas Pharmacol* 1994;23:S9-S14.
248. Foucart S, Patrick S, Oster L, de Champlain J: Effects of chronic treatment with losartan and enalaprilat on [3H]-norepinephrine release from isolated atria of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996;9:61-69.
249. Davis JO, Freeman RH: Mechanisms regulating renin release. *Physiological Reviews* 1976;56:1-56.
250. Dowell FJ, Henrion D, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI: Chronic infusion of low-dose angiotensin II potentiates the adrenergic response in vivo. *J of Hypertens* 1996;14:177-182.

251. Madwed JB, Winquist RJ: Effects of losartan (DUP 753) and enalaprilat on the mean arterial pressure response to phenylephrine. *J of Hypertens* 1994;12:159-162.
252. Dowell FJ, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Henrion D: Effects of chronic losartan treatment on vascular reactivity in normotensive rats. *J of Hypertens* 1997;15:523-529.
253. Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Viczaino F, Cachofeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, Lahera V: Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rats. *Hypertension* 1995;26:1074-1078.
254. Laher I, Thompson LP, Gagne L: Protein kinase C as a modulator of response amplification in vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 1990;27:333-340.
255. Cachofeiro V, Maeso R, Rodrigo E, al. e: Nitric oxide and prostaglandins in the prolonged effects of losartan and ramipril in hypertension. *Hypertension* 1996;26:236-243.
256. Oster L, Laflamme AK, Foucart S, de Champlain J: Losartan improves endothelial functions of mesenteric arteries in three experimental models of hypertension. *Hypertension* 1995;25:1360.
257. Maeso R, Navarro-Cid J, Munoz-Garcia R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V: Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 1996;28:967-972.
258. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, al. e: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923.
259. Ming Z, Parent R, Lavallée M: Beta-adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves K ATP channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation* 1997;95:1568-1576.
260. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Shichiri M, Marumo F: Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991;18:165-170.
261. Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH: Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:429-437.
262. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG: Role of endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1997;30:29-34.
263. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF: ETA receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and

- endothelial dysfunction in salt sensitive hypertension. *Hypertension* 1998;31:499-504.
264. Larivière R, Lebel M, Kingma I, Grose JH: Increased tissue angiotensin II induces endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of hypertensive uremic rats. *J of Hypertens* 1998;16:S96 (abrégé).
 265. Dumont Y, D'Amours M, Lebel M, Larivière R: Blood pressure-independent effect of angiotensin AT1 receptor blockade on renal endothelin-1 production in hypertensive uremic rats. *J of Hypertens* 2001;19:1479-1487.
 266. Larivière R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D: Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 1998;11:989-997.
 267. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC: Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovascular Research* 1999;43:300-307.
 268. Moreau P, Rabelink TJ: Endothelin and its antagonists in hypertension: Can we foresee the future? *Curr Hypertens Rep* 1999;1:69-78.
 269. Hall JE: Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am J Physiol (Regul Int Comp Physiol)* 1986;250:R960-R972.
 270. Balakrishnan SM, Wang HD, Gopalakrishnan V, Wilson TW, McNeil JR: Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hypertension* 1996;28:H2218-H2225.
 271. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy. *Circulation* 1997;96:1593-1597.
 272. Herizi A, Jover B, Bouriquet N, Mimran A: Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension* 1998;1:10-14.
 273. Bianciotti LG, de Bold AJ: Modulation of cardiac natriuretic peptide gene expression following endothelin type A receptor blockade in renovascular hypertension. *Cardiovas Res* 2001;49:808-816.
 274. Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T: Cardiovascular effects of endothelin-1 and endothelin antagonists in conscious, hypertensive ((mRen-2)27) rats. *Br J Pharmacol* 2000;131:1732-1738.
 275. Ficaï S, Herizi A, Mimran A, Jover B: Endothelin blockade in angiotensin II hypertension: prevention and treatment studies in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:1100-1103.

276. Hocher B, George I, Rebstock J, Bauch A, Schwartz A, Neumayer HH, Bauer C: Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* 1999;33:816-822.
277. Chen L, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V: Heterogeneity in vascular smooth muscle responsiveness to angiotensin II: role of endothelin. *Hypertension* 1995;26:83-88.
278. Wenzel RR, Ruthermann J, Bruck H, Schafers RF, Michel MC, Philipp T: Endothelin-A receptor antagonist inhibits angiotensin II and noradrenaline in man. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:151-157.
279. Dohi Y, Hahn A, Boulanger CM, Bühler FR, Lüscher TF: Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992;19:131-137.
280. Kaddoura S, Firth JD, Fuller SJ, Poole-Wilson PA, Sugden PH: Ventricular myocytes in culture express endothelin-1 (ET-1) but not ET-2 or ET-3 mRNA in response to the hypertrophic agonist phenylephrine and ET-1. *J Am Coll Cardiol* 1995;415A.
281. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA: Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. *Circulation* 1996;93:2068-2079.
282. Dao HH, Martens FMAC, Larivière R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J of Hypertension* 2001;19:1801-1812.
283. Wong-Dusting HK, Reid JJ, Rand MJ: Paradoxical effects of endothelin on cardiovascular noradrenergic neurotransmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989;16:229-233.
284. Nakamura M, Tabuchi Y, Rakugi H, Nagano M, Ogihara T: Actions of endothelin on adrenergic neuroeffector junction. *J of Hypertens* 1989;7:S132-S133.
285. Wong-Dusting HK, La M, Rand MJ: Mechanisms of the effects of endothelin on responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1990;17:269-273.
286. Yang Z, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF: Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. *Circulation* 1990;82:188-195.
287. Matsumura Y, Kita S, Okui T: Potentiation by endothelin-1 of vasoconstrictor response in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2001;415:45-49.
288. Zerrouk A, Champoux P, Safart M, Brisac A-M: Role of endothelium in the endothelin-1-mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats. *J of Hypertens* 1997;15:1101-1111.

289. Staessen JA, Wang J, bianchi G, Birkenhäger WH: Essential hypertension. *Lancet* 2003;361:1629-1641.
290. Calhoun DA, Zaman mA, Oparil S. Etiology and pathogenesis of systemic hypertension. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ, ed. *Cardiology*. Philadelphia: Mosby, 2004: 463-471.
291. Genest J: Progress in hypertension research. *Hypertension* 2001;38:e13-e18.
292. Carlson SH, Roysomutti s, Peng N, Wyss JM: The role of the central nervous system in NaCl-Sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2001;14:155S-162S.
293. Campese VM, Karubian F, Chevru I, Parise M, Sarkies N, Bigazzi R: Pressor reactivity to norepinephrine in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension* 1993;21:301-307.
294. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G: Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension* 1999;32:724-728.
295. Sowers JR, Mohanty PK: Autonomic nervous system function. *J of Hypertens Suppl* 1988;6:S49-S54.
296. DiBona GF: Interactions between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000;36:1083-1088.
297. Schiffrin EL: Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 2004;17:1192-1200.
298. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM: Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 2000;101:1653-1659.
299. Park JB, Schiffrin EL: Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J of Hypertens* 2001;19:921-930.
300. Benzuly KH, Padgett RC, Kaul S, Piegors DJ, Armstrong ML, Heistad DD: Functional improvement precedes structural regression of atherosclerosis. *Circulation* 1994;89:1810-1818.
301. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM: Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1994;330:1036-1040.
302. Humke U, Ziegler M: L'hypertension artérielle réno-vasculaire: Aspects actuels de la physiopathologie, du diagnostic et du traitement. *Ann Urol* 1997;31:64-76.

303. Spence JD: Treatment options for renovascular hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:411-416.
304. Navar LG, Ploth DW. Pathophysiology of renovascular hypertension. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 138-141.
305. Martinez-Maldonado M: Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991;17:707-719.
306. Grassi G, Esler M: The sympathetic nervous system in renovascular hypertension: lead actor or 'bit' player? *J of Hypertension* 2002;20:1071-1073.
307. Stern N, Tuck M. Pathophysiology of adrenal cortical hypertension. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 144-148.
308. Manger WN. Pathophysiology of pheochromocytoma. In: Izzo JL, Black HR, ed. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 148-150.
309. Parmer RJ, Zinder O: Catecholaminergic pathways, chromaffin cells, and human disease. *Ann NY Acad Sci* 2002;971:497-505.
310. Anonymous. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:532. (Izzo JL, Black HR, ed. *The essentials of high blood pressure*
311. Boyce PD, Waxman AB: Pulmonary hypertension: Work in progress. *J Nuc Cardiol* 2003;10:413-23.
312. Blaise G, Langleben D, Hubert B: Pulmonary arterial hypertension. *Anesthesiology* 2003;99:1415-32.
313. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM: Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;109:159-165.
314. Dzau VJ: The role of mechanical and humoral factors in growth regulation of vascular smooth muscle and cardiac myocytes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2:27-32.
315. Archer S, Rich S: Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* 2000;102:2781-2791.
316. Jeffery TK, Wanstall JC: Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* 2001;92:1-20.
317. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, al. e: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328:1732-1739.

318. Channick R, Badesch DB, Tapson VF, al. e: Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a placebo-controlled study. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:262-263.
319. Galié N, Hinderliter AL, Torbicki A, al. e: Effects of a oral endothelin-receptor antagonist bosentan on echocardiographic and Doppler measures in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1380-1386.
320. Mulvany MJ: Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:49-55.
321. Prewitt RL, Rice DC, Dobrian AD: Adaptation of resistance arteries to increases in pressure. *Microcirculation* 2002;9:295-304.
322. Touyz RM: The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:155-164.
323. Baumbach GL, Heistad DD: Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 1989;13:968-972.
324. Korsgaard N, Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Mulvany MJ: Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* 1993;22:523-526.
325. Schiffrin EL, Touyz RM: From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Physiol* 2004;287:H435-H446.
326. Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, P. M: ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovas Pharmacol* 2003;42:339-347.
327. Deng LY, Schiffrin EL: Morphological and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in rats. *Am J Physiol* 1991;261:H171-177.
328. Hashimoto H, Prewitt RL, Efaw CW: Alterations in the microvasculature of one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 1987;253:H933-H940.
329. Ono Z, Prewitt RL, Stacy DL: Arteriolar changes in developing and chronic stages of two-kidney, one clip hypertension. *Hypertension* 1989;14:36-43.
330. Girardot D, deBlois D, Moreau P: Time course expression of structural and regulatory proteins of focal adhesions in resistance arteries during eutrophic remodeling. *J Vasc Res* 2004;41:Abs# 3-7.
331. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD: Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28:505-506.

332. Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D: Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J of Hypertension* 2001;19:1965-1973.
333. Dao HH, Beaucage P, Moreau P: Small variation in local endothelin concentration triggers vascular hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension* 2004;44:536.
334. Rice DC, Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL: Src autophosphorylation is an early event in pressure-mediated signaling pathways in isolated resistance arteries. *Hypertension* 2002;39:502-507.
335. Martens FMAC, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P: Vessel-Specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 2002;39:16-21.
336. Muiesan ML, Rizzoni D, Salvetti M, Porteri E, Monteduro C, Guelfi D, D. C, Garavelli G, Agabiti-Rosei E: Structural changes in small resistance arteries and left ventricular geometry in patients with primary and secondary hypertension. *J of Hypertens* 2002;20:1439-1444.
337. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, Muiesan ML, Mulvany MJ, Rosei EA: Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension* 2000;35:931-935.
338. Rizzoni D, Porteri E, Giustina A, De Ciuceis C, Sleiman I, Boari GEM, Castellano M, Muiesan ML, Bonadonna S, Burattin A, Cerudelli B, Agabiti-Rosei E: Acromegalic patients show the presence of hypertrophic remodeling of subcutaneous small resistance arteries. *Hypertension* 2004;43:561-565.
339. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Girelli A, Rodella L, Bianchi G, Sleiman I, Rosei EA: Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 2001;103:1238-1244.
340. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Hollbrook NJ: Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996;97:508-514.
341. Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-635.
342. Sharifi AM, Li J-S, Endemann D, Schiffrin EL: Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J of Hypertens* 1998;16:457-466.
343. Deng LY, Schiffrin EL: Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992;262:H1782-1787.

344. Chillon J-M, Heistad DD, Baumbach GL: Effects of endothelin inhibition on cerebral arterioles in hypertensive rats. *Hypertension* 1996;27:794-798.
345. Sventek P, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL: Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Golblatt hypertension. *J of Hypertens* 1996;14:57-64.
346. Intengan HD, Park JB, Schiffrin EL: Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: Role of endothelin. *Hypertension* 1999;34:907-913.
347. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL: Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 2003;42:49-55.
348. Juhl CO, Jensen LS, Mulvany MJ: Time course of development of changes in the structure and reactivity of small veins from portal hypertensive rabbits. *Clin Sci* 1988;77:205-211.
349. Dobrian AD, Wade SS, Prewitt RL: PDGF-A expression correlates with blood pressure and remodeling in 1K1C hypertensive rat arteries. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1999;45:H2159-H2167.
350. Giummelly P, Lartaud-Idjouadiene I, Marque V, Niederhoffer N, Chillon J-M, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J: Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999;34:207-211.
351. Dao HH, Essalihi R, Graillon J-F, Larivière R, de Champlain J, Moreau P: Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J of Hypertension* 2002;20:1597-1606.
352. Laurant P, Adrian M, Berthelot A: Effect of age on mechanical properties of rat mesenteric small arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82:269-275.
353. Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel J-B: Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 1997;272:H851-H858.
354. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Seymour G, Tedgui A: Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1256-1262.
355. Maniu CV, Flipse TR, Patton JN, Fletcher GF. Physical activity and the cardiovascular system. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ, ed. *Cardiology*. Philadelphia: Mosby, 2004: 63-71.
356. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL: Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:26-33.

357. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL: Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 2001;281:H2528-H2538.
358. Schiffrin EL: Correction of remodeling and function of small arteries in human hypertension by cilazapril an angiotensin 1-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovas Pharmacol* 1996;27:S13-S18.
359. Simon G: Pathogenesis of structural vascular changes in hypertension. *J of Hypertens* 2004;22:3-10.
360. Simon G: Stimulation of vascular Na-K pump with subpressor angiotensin II in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;199:424-431.
361. Simon G, Cserep G, Limas C: Development of structural vascular changes with subpressor angiotensin II administration in rats. *Am J Hypertens* 1995;8:67-73.
362. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL: Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 2002;40:504-510.
363. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A: Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction. *Drugs* 2002;62:265-284.
364. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension - dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-397.
365. Daigle C, Martens FMAC, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P: Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovascular Disorders* 2004;4:1-8.
366. Black MJ, Bertram JF, Campbell JH, Campbell GR: Angiotensin II induces cardiovascular hypertrophy in perindopril-treated rats. *J of Hypertension* 1995;13:683-692.
367. Berk BC: Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiological Reviews* 2001;81:999-1030.
368. Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-456.
369. Illyes G, Talarico PJ, Simon G: Different structural vascular changes in angiotensin II-treated and cold-stressed rats. *Am J Hypertens* 2000;13:802-809.
370. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P: Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 1996;28:153-158.
371. Sachinidis A, Ko Y, Nettekoven W, Wiecek AJ, Düsing R, Vetter H: The effects of angiotensin II on DNA synthesis varies considerably in vascular

- smooth muscle cells from different wistar-Kyoto rats. *J of Hypertens* 1992;10:1159-1164.
372. Samani NJ, Jeffreys AJ, Morton DB, Naftilan AJ, Lindpaintner K, al. e: DNA fingerprints of spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats: Implications for hypertension research. *J of Hypertens* 1989;7:809-816.
 373. Campbell-Boswell M, Robertson LA: Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp Mol Pathol* 1981;35:265-276.
 374. El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL: Differential Ang II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H30-H39.
 375. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62:749-756.
 376. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T: Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989;13:305-314.
 377. Touyz RM, Deng LY, He G, Wu X-H, Schiffrin EL: Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J of Hypertens* 1999;17:907-916.
 378. Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM: Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 1998;31:1331-1337.
 379. Hu W-Y, Fukuda N, Kanmatsuse K: Growth characteristics, angiotensin II generation and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats. *J of Hypertension* 2002;20:1323-1333.
 380. deBlois D, Orlov SN, Hamet P: Apoptosis in Cardiovascular remodeling - Effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:539-542.
 381. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ: Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-259.
 382. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
 383. Yamada H, Horiuchi M, Dzau VJ: Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:156-160.
 384. Tea B-S, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D: Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle

cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 2000;35:1069-1073.

385. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M: Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: An in vitro gene transfer study. *Life Sciences* 1998;63:PL289-PL295.
386. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL: Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:257-264.
387. Diep QN, Li J-S, Schiffrin EL: In vivo study of AT1 and AT2 angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension* 1999;34:617-624.
388. Sharifi AM, Schiffrin EL: Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats - Effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998;11:1108-1116.
389. Wu L, Masaru I, Nakagami H, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M: Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling in angiotensin II type 2 receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:49-54.
390. Intengan HD, Thibault G, Li J-S, Schiffrin EL: Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1999;100:2267-2275.
391. Rossi GP, Cavallin M, Belloni AS, Mazzocchi G, Nussdorfer GG, Pessina AC, Sartore S: Aortic smooth muscle cell phenotypic modulation and fibrillar collagen deposition in angiotensin II-dependent hypertension. *Cardiovasc Res* 2002;55:178-189.
392. Intengan HD, Schiffrin EL: Vascular remodeling in Hypertension - Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001;38:581-587.
393. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato a, Saruta T: Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J of Hypertens* 1991;9:17-22.
394. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL: p38 MAP kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension* 2001;37:574-580.
395. Ford CM, Li S, Pickering JG: Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1843-1851.
396. Benetos A, Levy BI, Lacolley P, Taillard F, Duriez M, Safar ME: Role of Ang II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in

- spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3196-3201.
397. Henrion D, Kubis N, Lévy BI: Physiological and pathological functions of the AT2 subtype receptor of angiotensin II - From large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 2001;38:1150-1157.
 398. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL: Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J of Clin Invest* 1996;98:418-425.
 399. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL: Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 1998;31:487-492.
 400. Neves MF, Virdis A, Schiffrin EL: Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused rats: effects of aldosterone antagonism. *J of Hypertens* 2003;21:189-198.
 401. Itoh H, Mukoyama m, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993;91:2268-2274.
 402. Intengan HD, Schiffrin EL: Collagen degradation is diminished in mesenteric arteries of SHR after hypertension is established. *Hypertension* 1999;34:329A.
 403. Castoldi G, Di Gioia CRT, Pieruzzi F, D'Orlando C, Van De Greef WMM, Busca G, Sperti G, Stella A: Ang II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H635-H643.
 404. Laviades C, Varo N, fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Diez J: Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* 1998;98:535-540.
 405. Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, Beevers G, Lip GY: Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 level in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. *Int J Cardiol* 2000;75:43-47.
 406. Brasier AR, Recinos A, Eledrisi MS: Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. 2002;22:1257-1266.
 407. Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CAH, Hagl S, Libby P, Kübler W: Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1623-1629.
 408. Muller DN, Dechend R, Mervaala EMA, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC: NF-kB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000;35:193-201.
 409. Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL: Endothelial activation by angiotensin II through NFkB and p38 pathway:

- involvement of NF κ B -inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* 2003;195:402-410.
410. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal J-F, Michel J-B: Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:645-651.
 411. Hlubocka Z, Umnerova V, Heller s, Peleska J, Jindra A, Jachymova M, Kvasnicka J, Horky K, Aschermann M: Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor- markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: The effect of treatment with ACE inhibitors. *J Hum Hypertens* 2002;16:557-562.
 412. Malmqvist K, Wallén HN, Held C, Kahan T: Soluble cell adhesion molecules in hypertensive concentric left ventricular hypertrophy. *J of Hypertens* 2002;20:1563-1569.
 413. Yoon SO, Park SI, Yoon SY, al. e: Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 2002;277:30271-30282.
 414. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST: Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- α . *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C779-C784.
 415. Christensen KL, Mulvany MJ: Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. *J of Hypertens* 2001;19:1001-1006.
 416. Bevan RD: Trophic effects of peripheral adrenergic nerves on vascular structure. *Hypertension* 1984;6:III-19 - III-26.
 417. Bevan RD: Effect of sympathetic denervation on smooth muscle cell proliferation in growing rabbit ear artery. *Circ Res* 1975;37:14-19.
 418. Simon G, Csiky B: Effect of neonatal sympathectomy on the development of structural vascular changes in angiotensin II-treated rats. *J of Hypertens* 1998;16:77-84.
 419. Overbeck HW: Pressure-independent increases in vascular resistance in hypertension: Role of sympathoadrenergic influences and pressure. *Hypertension* 1979;2:780-786.
 420. Simon G, Illyes G: Structural vascular changes in hypertension - Role of angiotensin II, Dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension* 2001;37:255-260.

421. Vecchione c, Frata L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, al. e: Cardiovascular influences of alpha 1B-adrenergic receptor in mice. *Circulation* 2002;105:1700-1707.
422. Porteri E, Rizzoni D, Mulvany MJ, De Ciuceis C, Sleiman I, Boari GEM, Castellano M, Muiesan ML, Zani F, Agabiti-Rosei E: Adrenergic mechanism and remodeling of subcutaneous small resistance arteries in humans. *J of Hypertens* 2003;21:2345-2352.
423. Oparil S: The sympathetic nervous system in clinical and experimental hypertension. *Kidney Int* 1986;30:437-452.
424. Kara TJ, Somers VK. Sympathetic nervous system in human hypertension. In: Izzo JL, Black HR, ed. Hypertension primer. Dallas: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 123-125.
425. deBlois D, Schwartz SM, van Kleef EM, Su JE, Griffin KA, Bidani AK, Daemen MJAP, Lombardi DM: Chronic alpha1-adrenoreceptor stimulation increases DNA synthesis in rat arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1122-1129.
426. Todd ME, Gowen B: Arterial wall and smooth muscle cell developement in young wistar rats and the effects of surgical denervation. *Circ Res* 1991;69:438-446.
427. Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R: Alpha1-adrenergic stimulation and beta2-adrenergic inhibitor of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1990;37:30-36.
428. Blaes N, Boisseul JP: Growth-stimulating effect of catecholamines on the rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cell Physiol* 1983;116:167-172.
429. Erlinge D, Too H, Edvinsson L, Reis DJ, Wahlestedt C: Mitogenic effects of ATP on vascular smooth muscle cells vs, other growth factors and sympathetic cotransmitters. *Am J Physiol* 1993;265:H1089-H1097.
430. O'Callaghan CJ, Williams B: The regulation of human vascular smooth muscle extracellular matrix protein production by alpha- and beta-adrenoceptor stimulation. *J of Hypertens* 2002;20:287-294.
431. Schiffrin EL, Park JB, Quian P: Effect of crossing over hypertensive patients from beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J of Hypertens* 2002;20:71-78.
432. Alderman MH, al. e: Duretic versus alpa-blockers as first-step antihypertensive therapy. *Hypertension* 2003;42.
433. Dao HH, Moreau P: Endothelin receptor antagonist: novel agents for the treatment of hypertension? *Exp Opin Invest Drugs* 1999;8:1807-1821.

434. Li J-S, Larivière R, Schiffrin EL: Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in DOCA-salt hypertensive rats: evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994;24:183-188.
435. Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, al. e: Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension* 1999;33:759-765.
436. Li JS, Schrürch W, Schiffrin EL: Renal and vascular effects of chronic endothelin receptor antagonism in malignant hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996;9:803-811.
437. d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P, Luscher TF: Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: Effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension* 1997;30:905-911.
438. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F: Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997;99:1380-1389.
439. Hocher B, Liefeldt L, Thone-Reineke C, Orzechowski HD, Distler A, Bauer C, Paul M: Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension* 1996;28:196-201.
440. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT: Mineralo-corticoid blockade reduces vascular injury in stroke prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:451-458.
441. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992;19:753-757.
442. Park JB, Schiffrin EL: ETA receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension* 2001;37:1444-1449.
443. Baumbach GL: Effects of increased pulse pressure on cerebral arterioles. *Hypertension* 1996;27:159-167.
444. Li J-S, Knafo L, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL: Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996;40:H88-H93.
445. Safar M: Epidemiological findings imply that goals for drug treatment of hypertension need to be revised. *Circulation* 2001;103:1188-1190.
446. Sharifi AM, Schiffrin EL: Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J of Hypertens* 1997;15:1441-1448.

447. Yang ZH, Krasnici N, Luscher TF: Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effect of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 1999;100:5-8.
448. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S: Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990;258:C408-C415.
449. Hahn AWA, Resink TJ, Kern F, al e: Peptide vasoconstrictors, vessel structure, and vascular smooth muscle proliferation. *J Cardiovas Pharmacol* 1993;22:S37-S40.
450. Rizvi MAD, Katwa L, Spadone DP, Myers PR: The effects of endothelin-1 on collagen type I and type II synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:243-252.
451. Zimmerman BG, Sybertz EJ, Wong PC: Interaction between sympathetic and renin angiotensin system. *J of Hypertens* 1984;2:581-587.
452. Bruijns RHJ: Effects of chemical sympathectomy on angiotensin II-induced neointimal growth in the balloon-injured rat carotid artery. *J Vas Res* 1998;35:124-133.
453. van Kleef EM, Smits JFM, De Mey JGR, Cleutjens JPM, Lombardi DM, Schwartz SM, Daemen MJAP: Alpha1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ Res* 1992;70:1122-1127.
454. van Kleef EM, Smits JFM, Schwartz SM, Daemen MJAP: Doxazosin blocks the angiotensin II-induced smooth muscle cell DNA synthesis in the media, but not in the neointima of the rat carotid artery after balloon injury. *Cardiovasc Res* 1996;31:324-330.
455. van Kleef EM, Fingerle J, Daemen MJAP: Angiotensin II-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT1 receptor mediated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:857-863.
456. Christensen KL, Fenger-Gron J, Mulvany MJ: Intestinal blood flow by feed arteries as well as microscopic resistance vessels in freely moving rats. *J Vas Res* 1996;33:10.
457. Luscher TF, Boulanger C, Dohi Y, Yang Z: Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992;19:117-130.
458. Hahn AWA, Resnik TJ, Scott-Burden T, Powell J, Roni Y, Bühler FR: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regulation* 1990;1:649-659.
459. Simon G, Illyes G, Csiky B: Structural vascular changes in hypertension: Role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure and time. *Hypertension* 1998;32:654-660.

460. Moser L, Faulhaber J, Wiesner RJ, Ehmke H: Predominant activation of endothelin-dependent cardiac hypertrophy by norepinephrine in rat left ventricle. *Am J Physiol (Regul Int Comp Physiol)* 2002;282:R1389-R1394.
461. Touyz RM: Recent advances in intracellular signaling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003;12:165-174.
462. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW: Temporel dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G proteins subunits. *J Biol Chem* 1998;273:19772-19777.
463. Saito Y, Berk BC: Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:3-7.
464. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW: Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle - New concepts. *Hypertension* 1997;29:366-373.
465. Servant MJ, Giasson E, Meloche S: Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:16047-16052.
466. Malarkey K, McLees A, Paul A, Gould GW, Plevin R: The role of protein kinase C in activation and termination of mitogen-activated protein kinase activity in angiotensin II-stimulated rat aortic smooth muscle cells. *Cell Signaling* 1996;8:123-129.
467. Hanada M, Saito E, Kambe T, Hagiwara Y, Kubo T: Effects of genistein and staurosporine on angiotensin II-induced DNA synthesis, protein synthesis and mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Bio Pharm Bull* 1998;21:1045-1049.
468. Haendeler J, Berk BC: Angiotensin II mediated signal transduction - Important role of tyrosine kinases. *Regul Pept* 2000;95:1-7.
469. Oda Y, Renaux B, Bjorge J, saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD: cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:606-617.
470. Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC: Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;82:7-12.
471. Touyz RM, He G, Wu X-H, Park JB, El Mabrouk M, Schiffrin EL: Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 2001;38:56-64.

472. Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y: Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;33:201-206.
473. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL: c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox - Role in superoxide generation bt angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:981-987.
474. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, al. e: Angiotensin II stimulation of NADPH oxidase activity. Upstream mediators. *Circ Res* 2002;91:406-413.
475. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ: Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth faxctor receptor. *Kidney Int* 2000;58:549-558.
476. Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert G, Moreau P, Meloche S: EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C446-C455.
477. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A: The EGF receptors as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:408-412.
478. Kalmes A, Daum G, Clowes AW: EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann NY Acad Sci* 2001;947:42-54.
479. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW: Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:489-495.
480. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ: Gbeta-gamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1997;272:4637-4644.
481. Rosen LB, Greenberg ME: Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1113-1118.
482. Tsai W, Morielli AD, Peralta EG: The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J* 1997;16:4597-4605.
483. Saito S, Frank GD, Motley ED, Dempsey PJ, Utsunomiya H, Inagami T, Eguchi S: Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:1023-1029.
484. Touyz RM, Wu X-H, He G, Salomon S, Schiffrin EL: Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased c-terminal Src kinase activity in vascular smooth

muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002;39:479-485.

485. Eguchi SK, Numaguchi H, Iwasaki T, al. e: Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998;273:8890-8896.
486. Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH, Proud CG: Ang II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2004;287:H1232-H1238.
487. Yamakawa T, Tanaka S-i, Kamei J, Kadonosono K, Okuda K: Phosphatidylinositol 3-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Eur J of Pharmacology* 2003;478:39-46.
488. Volarevic S, Thomas G: Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000;65:101-127.
489. Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 1997;81:249-257.
490. Dugourd C, Gervais M, Corvol P, Monnot C: Akt is a major downstream target of PI3-kinase involved in angiotensin II-induced proliferation. *Hypertension* 2003;41:882-890.
491. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y: Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999;140:4659-4668.
492. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y: Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *European Journal of Pharmacology* 1999;375:133-138.
493. Douglas SA, Ohlstein EH: Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vas Res* 1997;34:152-164.
494. Daou GB, Srivastava AK: Reactive oxygen species mediate endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2004;37:208-215.
495. Stefanovsky vY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler L, Rothblum LI, Moss T: An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Molecular Cell* 2001;8:1063-1073.
496. Luyken J, Hannan RD, Cheung JY, Rothblum LI: Regulation of rDNA transcription during endothelin-1-induced hypertrophy of neonatal cardiomyocytes. *Circ Res* 1996;78:354-361.

497. Brandenburger Y, Arthur JF, Woodcock EA, Du X-J, Gao X-m, Autelitano DJ, Rothblum LI, Hannan R: Cardiac hypertrophy in vivo is associated with increased expression of the ribosomal gene transcription factor UBF. *FEBS* 2003;548:79-84.
498. Brehm BR, Klausserner M, Wolf SC: Chronic elevated endothelin-1 concentrations regulate mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in vascular smooth muscle cells. *Clin Sci* 2002;103:137S-140S.
499. Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardiner DG: c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1998;273:35185-35193.
500. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, sano M, Kato T, Tahara S, Hakuno D, Sato T, Manabe T, Konishi F, Ogawa S: Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:139-150.
501. Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D: ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C251-C260.
502. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A: EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402:884-888.
503. Flamant M, Tharaux PL, Placier S, Henrion D, Coffman T, Chatziantoniou C, Dussaulne J-C: Epidermal growth factor receptor transactivation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 2002;17:327-329.
504. Suzuki E, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Omata M, Hirata Y: Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression. *Circ Res* 1999;84:611-619.
505. Burgering BM, Coffey PJ: Protein kinase B (c-akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995;376:599-602.
506. Schiffrin EL: Vascular smooth muscle growth and extracellular matrix deposition: is there a role for the sympathetic nervous system? *J of Hypertens* 2002;20:179-181.
507. Deng LY, Schiffrin EL: Endothelin-1 gene expression in blood vessels and kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR), L-NAME-treated SHR, and renovascular hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1998;31:S380-S383.
508. Hong H-J, Chan P, Liu J-C, Juan S-H, Huang M-T, Lin J-G, Cheung T-H: Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovas Res* 2004;61:159-168.

509. Dao HH, Moreau S, Bouvet C, Beaucage P, Larivière R, Servant MJ, de Champlain J, Moreau P: Endothelin-1 produces hyperplasia through an Akt-dependent modulation of cell cycle in small mesenteric arteries in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;[en révision].
510. Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J: Endothelin mediates superoxide in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;38:589-596.
511. Slaninka-Miceska M, Bogdanska J, Korneti P, Kostova E, Jovanoska E, Petrov S: Effect of angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist on the endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats in correlation with the nitric oxide system. *Bratisl Lek Listy* 2003;104:342-346.
512. Montagnani M, Potenza MA, Rinaldi R, Mansi G, Nacci C, Serio M, Vulpis V, Pirrelli A, Mitolo-Chieppa D: Functional characterization of endothelin receptors in hypertensive resistance vessels. *J of Hypertens* 1999;17:45-52.
513. Fei J, Viedt C, Soto U, Elsing C, Jahn L, Kreuzer J: Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1244-1249.
514. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T: Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678.
515. Mezzetti A, Guglielmi MD, Pierdomenico SD, Costantini F, Cipollone F, De Cesare D, Bucciarelli T, Uchino S, Chiarelli F, Cuccurullo F, Romano F: Increased systemic oxidative stress after elective endarterectomy: relation to vascular healing and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2659-2665.
516. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujimo M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M: Endothelin is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993;92:398-403.
517. Gray MO, Long CS, J.E. K, Li HT, Karliner JS: Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovas Res* 1998;40:352-363.
518. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF: Differential modulation of the renal and myocardial endothelin system by angiotensin II in vivo. *J of Cardiovas Pharmacol* 1998;31:S265-S268.
519. Ehmke H, Faulhaer J, Munter K, Kirchengast M, Wiesner RJ: Chronic ETA receptor blockade attenuates cardiac hypertrophy independently of blood pressure effects in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 1999;33:954-960.

520. De Smet HR, Menadue MF, Olivier JR, Phillips PA: Endothelin ETA receptor antagonism does not attenuate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vivo in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2003;30:278-283.
521. Rothermund L, Pinto YM, Hocher B, Vetter R, Leggewie S, Kobetamehl P, Orzechowski HD, Kreutz R, Paul M: Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake. *Circulation* 2000;102:1582-1588.
522. Schiffrin EL: The angiotensin-endothelin relationship: does it play a role in cardiovascular and renal pathophysiology? *J of Hypertens* 2003;21:2245-2247.
523. Alexander BT, Cockrell KL, Rinewalt AN, Herrington JN, Granger JP: Enhanced renal expression of preproendothelin mRNA during chronic angiotensin II hypertension. *Am J Physiol (Regul Int Comp Physiol)* 2001;280:R1388-1392.
524. Riggleman A, Harvey J, Baylis C: Endothelin mediates some of the renal actions of acutely administrated angiotensin II. *Hypertension* 2001;38:105-109.
525. Casellas D, Bouriquet N, Herizi A: Bosentan prevents preglomerular alterations during angiotensin II hypertension. *Hypertension* 1997;30:1613-1620.
526. Chatziantoniou C, Dussaulne J-C: endothelin and renal vascular fibrosis: of mice and men. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:31-36.
527. Cao Z, Cooper ME, Wu LL, Cox AJ, Jandeleit-Dahm K, Kelly DJ, Gilbert RE: Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 2000;36:561-568.
528. Potter GS, Johnson RJ, Fink GD: Role of endothelin in hypertension of experimental chronic renal failure. *Hypertension* 1997;30:1578-1584.
529. Rothermund L, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R: Renal damage is not improved by blockade of endothelin receptors in primary renin-dependent hypertension. *J of Hypertension* 2003;21:2389-2397.
530. Fernandez-Cruz A, Martin P, Fernandez L, al. e: Plasma endothelin is increased in young essential hypertensives but not in elderly essential or diabetic hypertensives. *J of Hypertens* 1993;11:S146-S147.
531. Miyauchi T, Yanagisawa M, Iida K, al. e: Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am Heart J* 1992;123:1092-1093.
532. Erguel A: Hypertension in black patients. An emerging role of the endothelin system in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2000;36:62-67.
533. Zoccali C, Leonardis D, Parlongo s, Mallamaci F, Postorino M: Urinary and plasma endothelin-1 in essential hypertension and in hypertension secondary to renoparenchymal disease. *Nephrol Dialysis Transpl* 1995;10:1320-1323.

534. Poch E, Jimenez W, Feu F, al. e: Increased plasma endothelin concentration in atherosclerotic renovascular hypertension. *Nephron* 1995;71:291-296.
535. Stockenhuber F, Gottsauner -W, M., Marosi L, Liebisch B, Kurz RW, Balcke P: Plasma levels of endothelin in chronic renal failure and after renal transplantation: impact on hypertension and cyclosporin A-associated nephrotoxicity. *Clin Sci* 1992;82:255-258.
536. Laughlin MH, McAllister RM: Exercise training-induced coronary vascular adaptation. *J Appl Physiol* 1992;73:2209-2225.
537. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC: Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:1580-1586.
538. Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heulbein DM, Sandberg SM, Burnett JC: Circulating and tissue endothelin immnoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001.
539. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, Albertin G, Della Rocca F, Gerosa G, Casarotto D, Sartore S, Pauletto P, Pëssina AC: Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999;99:1147-1155.
540. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E: Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 1996;28:785-790.
541. Grundy SM, Abate N. Obesity. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ, ed. *Cardiology*. Edinburgh: Mosby, 2004: 1463-1468.
542. Giacchetti G, Faloia E, Sardu C, Camilloni M, Mariniello B, Gatti C, Garrapa G, Guerrieri M, Mantero F: Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *Int J of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2000;24:S142-S143.
543. Tochikubo O, Miyajima E, Okabe K, Imai K, Ishii M: Improvement of multiple coronary risk factors in obese hypertensives by reduction of intra-abdominal visceral fat. *Japanese Heart Journal* 1994;35:715-725.
544. Barton m, Carmona R, Morawietz H, d'Uscio LV, Goettsch W, Hillen H, Haudenschild CC, Krieger JE, Münter K, Lattmann T, Lüscher TF, Shaw S: Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo. *Hypertension* 2000;35:329-336.
545. Tiret L, Poirier O, Hallet V, McDonagh T, Morrison C, McMurray J, Dargie H, Arveiler D, Ruidavets J, Liuc G, Evans A, Cambien F: The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension* 1999;33:1169-1174.

546. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA: Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 2004;43:36-40.
547. Traupe T, Lang M, Goettsch W, Münter K, Morawietz H, Vetter H, Barton M: Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. *J of Hypertens* 2002;20:2239-2245.
548. Asberg A, Midtvedt K, Vassbotn T, Hartmann A: Better microvascular function on long-term treatment with lisinopril than with nifedipine in renal transplant recipients. *Nephrol Dialysis Transpl* 2001;16:1465-1470.
549. Nishiyama A, Kobori H, Fukui T, Zhang G-X, Yao L, Rahman M, Hitomi H, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y: Role of angiotensin II and reactive oxygen species in cyclosporine A-dependent hypertension. *Hypertension* 2003;42:754-760.
550. Radeau T, Lebel M, Houde I, Larivière R, Mauriège P, Kingma I, Lachance J-G, Noël R, Després J-P, Bergeron J: Endothelin-1 levels and cardiovascular risk factors in renal transplant patients. *Clinical Biochemistry* 2004;37:1072-1078.
551. Mulvany MJ: Resistance vessel growth and remodeling: cause or consequence in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 1995;9:479-485.
552. Rizzoni D, Porteri E, Boari GEM, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E: Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 2003;108:2230-2235.
553. Schwartzkopff B, Brehm M, Mundhenke M, Strauer BE: Repair of coronary arterioles after treatment with perindopril in hypertensive heart disease. *Hypertension* 2000;36:220-225.
554. Dipasquale P, Valdes L, Albano V, Bucca V, Scalzo S, Pieri D, Maringhini G, Paterna S: Early captopril treatment reduces plasma endothelin concentrations in the acute and subacute phases of myocardial infarction: a pilot study. *J Cardiovas Pharmacol* 1997;29:202-208.
555. Uemasu J, Munemura C, Fujihara M, Kawasaki H: Inhibition of plasma endothelin-1 concentration by captopril in patients with essential hypertension. *Clin Nephrol* 1994;41:150-152.
556. Ikeda T, Ohta K, Okada M, Kawai N, Nakao R, Siegl PK, Kobayashi T, Miyauchi T, Nishikibe M: Antihypertensive effects of a mixed endothelin-A and -B-receptor antagonist, J-104132, were augmented in the presence of an AT1 -receptor antagonist, MK-954. *J of Cardiovas Pharmacol* 2000;36:S337-S341.
557. Iwanaga Y, Kihara Y, Inagaki K, Onozawa y, Yoneda T, Kataoka K, Sasayama S: Differential effects of angiotensin II versus endothelin-1 inhibitions in hypertrophic left ventricular myocardium during transition to heart failure. *Circulation* 2001;104:606-612.

558. Tzanidis A, Lim S, Hannan R, See F, Ugoni AM, Krum H: Combined angiotensin and endothelin receptor blockade attenuates adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction in the rat: possible role of transforming growth factor beta(1). *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:969-981.
559. Fraccarollo D, Bauersachs J, Kellner M, Galuppo P, Erl G: Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mon-- versus combination therapy. *Cardiovasc Res* 2002;54:85-94.
560. Qiu CB, Qiu CS, Hess P, Clozel JP, Clozel M: Additional effect of endothelin receptor blockade and angiotensin converting enzyme inhibition in rats with chronic heart failure. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:541-548.
561. Kiwoski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O: Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995;346:732-736.
562. Massart PE, Hodeige DG, Van Mechelen H, Charlier AA, Ketelslegers JM, Heyndrickx GR, Donckier JE: Angiotensin II and endothelin-1 receptor antagonists have cumulative hypotensive effects in canine Page hypertension. *J of Hypertens* 1998;16:835-841.
563. Benigni A, Corna D, Maffi R, Benedetti G, Zoja C, Remuzzi G: Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy. *Kidney Int* 1998;54:353-359.
564. Amann K, Simonaviciene A, Medwedewa T, Koch A, Orth S, Gross ML, Haas C, Kuhlmann A, Linz W, Scholkens B, Ritz E: Blood pressure-independent additive effects of pharmacologic blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progression in a low-renin model of renal damage. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2572-2584.
565. Pollock DM, Derebail VK, Yamamoto K, Pollock JS: Combined effects of AT(1) and ET(A) receptor antagonists, candesartan, and A-127722 in DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmac* 2000;34:337-342.
566. Bohlender J, Gerbaulet S, Kramer J, Gross M, Kirchengast M, Dietz R: Synergistic effects of AT1 and ETA receptor blockade in a transgenic, angiotensin II-dependent, rat model. *Hypertension* 2000;35:992-997.

ANNEXE

Heterogeneity in the Acute Control of Vascular Protein Synthesis in vivo

Pierre Beaucage^a Nobuharu Yamaguchi^a Richard Larivière^b
Pierre Moreau^a

^aFaculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, et ^bCentre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec, Université Laval, Québec, Canada

Key Words

Renin-angiotensin system · Angiotensin II ·
Sympathetic nervous system · Norepinephrine ·
Endothelin · Hypertrophy · Vascular remodeling

Abstract

In response to both hemodynamic and neurohumoral changes, the cardiovascular system remodels and this process could contribute to end organ damage. The aim of this study was to determine the early in vivo interactions between 3 systems known to contribute to vascular hypertrophic remodeling, in conduit and resistance arteries. Exogenous angiotensin II, norepinephrine and endothelin 1 administration elevated protein synthesis in the aorta and in small mesenteric arteries. In small arteries, the effect of angiotensin II was blocked by angiotensin II type 1, α -adrenergic and endothelin receptor antagonists, while only the α -adrenergic and endothelin receptor antagonists inhibited the effect of norepinephrine. Moreover, only the endothelin receptor antagonist significantly blunted the effect of exogenous endothelin on protein synthesis. In the aorta, the stimulation of angiotensin II on protein synthesis was also inhibited by the 3 antagonists. However, only the α -adrenoceptor antagonist blunted the response to norepinephrine, and the 3

antagonists prevented the endothelin-induced elevation of protein synthesis. The blood pressure effects of the drugs did not correlate with their capacity to stimulate or inhibit vascular protein synthesis. In conclusion, interactions in the control of protein synthesis are heterogeneous along the vascular tree. In small arteries, the interaction is linear with endothelin as the downstream effector. In the aorta, the local sympathetic nervous system appears to control protein synthesis. The heterogeneity in downstream effectors should be considered in studies investigating signaling events related to protein synthesis, which is used as an early marker of hypertrophy.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cardiovascular diseases are associated with enhanced activity of numerous regulatory entities such as the sympathetic nervous system (SNS), the renin-angiotensin system (RAS) and the endothelin (ET) system. These systems, although acutely beneficial, are thought to become deleterious when chronically activated. Cardiovascular remodeling represents one of the facets by which these systems could alter circulatory integrity [1, 2]. Hypertrophic remodeling is a generic term used to describe the

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
1018–1172/03/0402–0123\$19.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/jvr

Dr. Pierre Moreau, PhD
Faculté de pharmacie, Université de Montréal
PO Box 6128, Station Centre-ville, Montréal H3C 3J7 (Canada)
Tel. +1 514 343 6111, ext. 3342, Fax +1 514 343 2102
E-Mail pierre.moreau@umontreal.ca

increased cross-sectional area of arteries, and it seems to proceed either through growth (actual hypertrophy) or proliferation (hyperplasia). Infusion of exogenous angiotensin II (Ang II) leads to an increase in media thickness, media/lumen ratio and cross-sectional area of small arteries, by increasing cell size [3, 4], or cell replication in some cases [5]. The same stimulus leads to aortic hypertrophy by increasing protein and DNA synthesis *in vivo* [6, 7]. Furthermore, Ang II enhances protein synthesis *in vivo* in small and large arteries, a process required for both hypertrophy and hyperplasia [8, 9]. The SNS is also a potent modulator of vascular remodeling. Inward hypertrophic remodeling (true hypertrophy) of small mesenteric arteries has been reported following chronic norepinephrine (NE) administration [10]. In the aorta, the same treatment induced medial hyperplasia that leads to structural changes [11]. Thus, different types of arteries can remodel through different mechanisms (hypertrophy or hyperplasia) when exposed to similar environments. Since remodeling represents the final integration of protein synthesis, mitosis and apoptosis signals [1, 2], distinct interactions between key regulatory systems may operate in different types of arteries.

ET appears as a necessary intermediate in the hypertrophic remodeling of small arteries stimulated by Ang II [12], NE [10], aldosterone [13] or vasopressin [14]. Indeed, ET is overexpressed in the vascular wall of small arteries, and ET receptor antagonists (ETRA) are effective to prevent vascular hypertrophy, often in a pressure-independent fashion [for a review, see 15]. The role of ET in conduit artery remodeling is less well characterized. Overall, the studies suggest that ETRA can regress aortic hypertrophy induced by exogenous Ang II or NE, or in the DOCA-salt hypertension model [11, 16, 17].

The aim of this study was to investigate the interaction between the SNS, the RAS and ET in the control of vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries to elucidate a potential mechanism by which the remodeling discrepancy in these vessel types could be explained. Studying early interactions could help to elucidate key events that will dictate the development of the remodeling process and not its maintenance, as most chronic studies tend to address. Indeed, we have previously shown that ET is transiently involved in small artery remodeling [10], adding support to the concept that early and late events may not proceed similarly. To do so, protein synthesis was measured in conduit and small arteries at the end of the first 24 h of *in vivo* stimulation with Ang II, NE or ET alone or with appropriate antagonists.

Materials and Methods

Surgical Procedures and Treatments

Male Sprague-Dawley rats (300–400 g) were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, *i.p.*) for implantation of polyethylene catheters in the femoral artery and vein. Tubing was tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected by a tethering system. Vascular protein synthesis was induced by implanting an osmotic pump (model 1003D Alzet) releasing a constant dose of Ang II (400 ng/kg/min, *s.c.*, *n* = 27 [9]), NE (2.5 µg/kg/min, *s.c.*, *n* = 24 [10]) or ET (5 pmol/kg/min, *i.p.*, *n* = 24 [18]). Dosages were selected from pilot studies to stimulate protein synthesis, with minimal impact on blood pressure. Control rats were sham operated, but pumps were not implanted (*n* = 14: 8 for NE and Ang II and 6 for studies with ET). In subgroups of treated rats, irbesartan [15 mg/kg; a selective Ang II type 1 (AT₁) receptor antagonist], darusentan (LU135252, 10 mg/kg; a selective ET_A receptor antagonist) or prazosin (1 mg/kg; an α-adrenoceptor antagonist) was administered subcutaneously twice, 12 h apart starting at the time of osmotic pump implantation. Twenty-two hours after surgery, an intravenous L-[4,5-³H]leucine infusion was started for a period of 4 h (12 µCi/h) to allow quantification of protein synthesis in all rats. Numbers of rats for individual groups are presented in table 1. Arterial pressure and heart rate were also recorded during the infusion of leucine through the arterial catheter. The protocols were approved by the Animal Care Committee of our institution.

Protein Synthesis Measurement

Protein synthesis measurement was done as previously described and validated [8, 9]. Briefly, at the end of the leucine infusion, animals were sacrificed (anesthesia and exsanguination) and the aorta and small mesenteric arteries (arteries branching from, but excluding the superior mesenteric artery and extending to the intestine, from 350 to less than 100 µm of internal diameter) were harvested and rapidly frozen. Frozen tissues were powdered in liquid nitrogen, and proteins were precipitated overnight in trichloroacetic acid (10%), washed once with trichloroacetic acid (10%) and twice with water. Tissues were solubilized with KOH at 45 °C for 3 h. For each tissue, 15 µl of the final solution was used for measurement of protein concentration by the method of Lowry et al. [19] and 1 ml to measure the incorporation of labeled leucine in newly synthesized proteins by scintillation counting. Data are expressed as counts per minute per milligram of proteins, which represents the vascular protein synthesis rate.

Catecholamine, Plasma Renin Activity and ET Measurements

Nineteen additional Sprague-Dawley rats were catheterized, and osmotic pumps releasing Ang II, NE or ET were implanted subcutaneously or intraperitoneally, as described above. Twenty-four hours later, blood samples were collected through the arterial catheter. One milliliter of blood sample was withdrawn for plasma catecholamine measurements in tubes containing a preservative solution of ethylene glycol bis-(aminoethylether)tetra-acetic acid, reduced glutathione, sodium hydroxide and HPLC grade water. Samples were then centrifuged at 15,000 g for 5 min, and plasma was collected. Concentration determination was performed by HPLC, as previously described [20].

Another milliliter was collected in tubes containing 20 µl of an EDTA solution (20 mg/ml). The samples were centrifuged at 15,000 g for 5 min and plasma renin activity (PRA) was assessed on

Table 1. Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	n	DBP mm Hg	SBP mm Hg	MBP mm Hg	HR beats/min
Control	14	86 ± 2	119 ± 2	97 ± 2	380 ± 6
Ang II	7	112 ± 6 ^a	138 ± 5 ^a	121 ± 6 ^a	383 ± 10
+ Irbesartan	4	77 ± 3 ^b	110 ± 4 ^b	88 ± 3 ^b	414 ± 7
+ Prazosin	6	96 ± 2 ^b	129 ± 3	107 ± 2	414 ± 13
+ Darusentan	10	104 ± 2	140 ± 13	116 ± 6	418 ± 11
NE	5	100 ± 7	133 ± 10	111 ± 8	420 ± 14 ^a
+ Irbesartan	8	74 ± 5 ^b	106 ± 3 ^b	85 ± 3 ^b	395 ± 4
+ Prazosin	5	105 ± 1	139 ± 3	116 ± 1	383 ± 3 ^b
+ Darusentan	6	86 ± 5	118 ± 2	97 ± 4	406 ± 5
ET-1	6	87 ± 5	126 ± 5	100 ± 5	383 ± 6
+ Irbesartan	6	77 ± 3	115 ± 2 ^b	90 ± 2	403 ± 7
+ Prazosin	6	80 ± 3	112 ± 2 ^b	90 ± 2	425 ± 12 ^b
+ Darusentan	6	85 ± 4	122 ± 2	98 ± 3	382 ± 8

Values are means ± SEM. n = Number of rats per group; control rats were pooled (NE and Ang II studies, n = 8, + ET study, n = 6). DBP = Diastolic blood pressure; SBP = systolic blood pressure; MBP = mean blood pressure; HR = heart rate. ^ap < 0.05 versus control conditions, ^bp < 0.05 versus treatment with Ang II, NE or ET-1.

plasma by a commercial radioimmunoassay kit (New England Nuclear, Boston, Mass., USA).

Finally, a third milliliter was collected in the presence of EDTA and used to measure ET levels by radioimmunoassay as previously described [21].

Drugs and Statistical Analysis

Ang II, NE and prazosin were purchased from Sigma-Aldrich, while ET was provided by Calbiotech. Irbesartan was a gift from Bristol-Myers Squibb (Montreal, Canada) and darusentan (formerly LU135252) was kindly provided by Knoll-BASF Pharma (Ludwigshafen, Germany).

Data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were selected a priori and performed using Bonferroni's correction: the control group was compared with Ang II, NE and ET groups. The Ang II group was compared with Ang II + irbesartan, Ang II + prazosin and Ang II + darusentan. Similar comparisons were chosen for the NE and the ET groups. Differences were considered statistically significant at p < 0.05.

Results

Hemodynamic Measurements

Stimulation with Ang II for a 24-hour period increased diastolic, systolic and mean blood pressures, as compared to the control group (table 1). Irbesartan significantly reduced those values, while darusentan had no significant

effect. Prazosin only reduced diastolic blood pressure significantly. The doses of exogenous NE and ET had no significant effect on pressure parameters. Irbesartan also reduced blood pressure in NE- and ET-treated rats (only SAP was significant for ET). Prazosin significantly reduced systolic blood pressure in ET-treated animals. Exogenous NE administration elevated heart rate, and this effect was blocked only by prazosin (table 1).

Protein Synthesis

In mesenteric arteries, basal protein synthesis was 412 ± 15 cpm/mg, which was elevated by 35% with Ang II infusion, by 67% with NE and by 58% with ET stimulation (fig. 1). With Ang II as the agonist, treatment with an AT₁, ET_A or α-adrenoceptor antagonist prevented the elevation of protein synthesis. With NE, the administration of ET_A and α-adrenoceptor antagonists was effective, while the AT₁ antagonist produced a small and nonsignificant decrease. With ET as the agonist, only the ET_A antagonist prevented significantly the elevation of protein synthesis, while the effect of AT₁ and α-adrenoreceptor antagonists did not reach statistical significance.

In aortas, basal protein synthesis was 251 ± 19 cpm/mg. This rate was elevated by 69% with Ang II stimulation, 83% with NE and 25% with ET (p < 0.05, fig. 2). As in mesenteric arteries, the elevation of protein synthesis

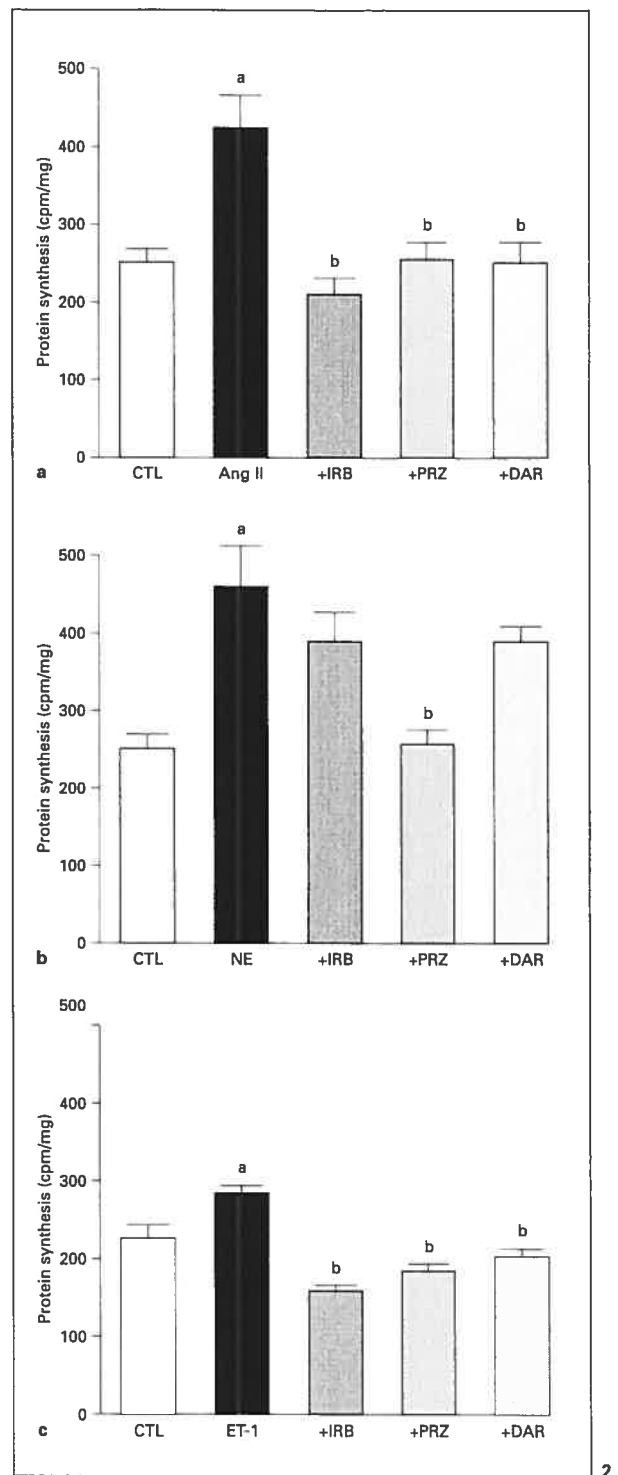
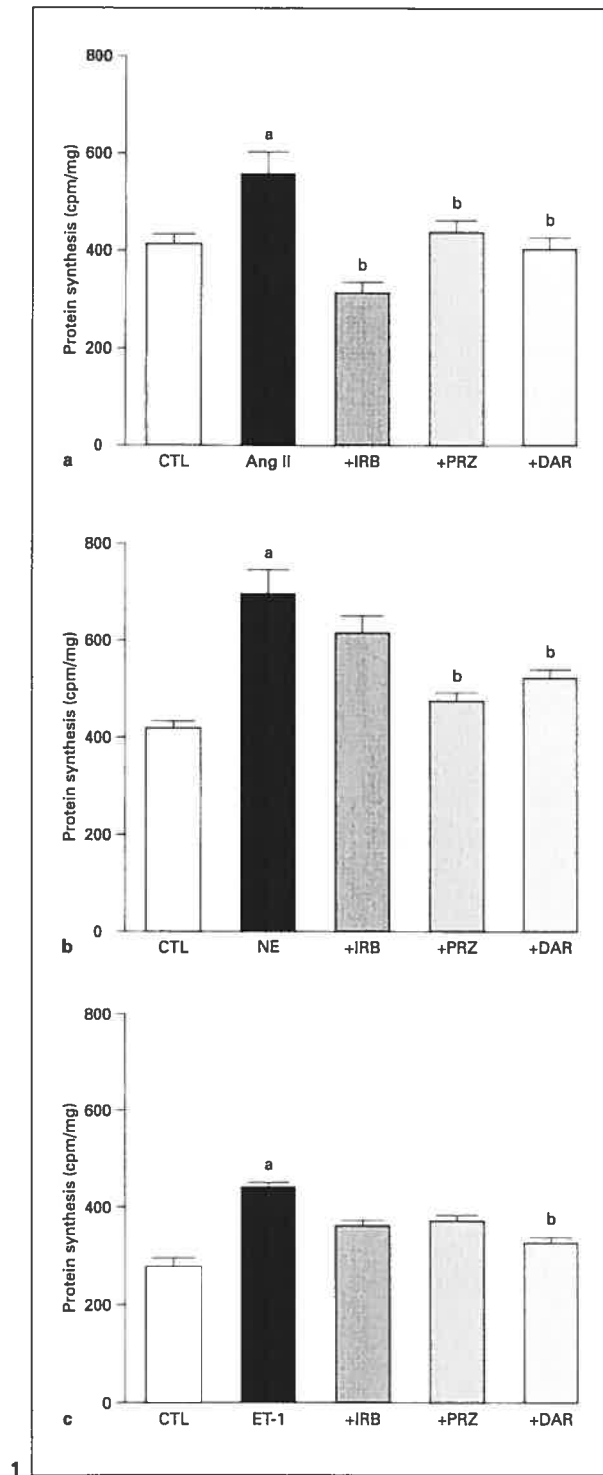


Table 2. PRA and plasma concentrations of NE, epinephrine (EPI) and ET-1, following in vivo stimulation with Ang II, NE and ET-1

	n	PRA ng/ml/h	NE ng/ml	EPI ng/ml	ET-1 pg/ml
Control	5	8.8 ± 1.0	0.36 ± 0.10	0.10 ± 0.04	15.3 ± 2.7
Ang II	5	1.2 ± 0.6*	0.60 ± 0.23	0.09 ± 0.02	12.7 ± 1.8
NE	5	8.5 ± 0.6	7.6 ± 1.8*	0.15 ± 0.03	13.0 ± 0.9
ET-1	4	6.8 ± 1.2	0.37 ± 0.11	0.11 ± 0.03	25.4 ± 2.3*

Values are means ± SEM. * p < 0.05 versus control conditions.

induced by Ang II was blunted in the presence of the 3 antagonists. However, only the α -adrenoceptor antagonist prevented the effect of NE of protein synthesis. As with Ang II stimulation, the effect of ET on protein synthesis was blocked by all 3 antagonists.

PRA, Catecholamine and ET Levels

Measurement of PRA indicates that the doses of NE and ET chosen did not influence the release of renin (table 2). As expected, administration of Ang II inhibited renin release through its negative feedback mechanism. The administration of NE significantly increased its plasma levels. Although ET had no effect on plasma NE levels, Ang II had a tendency to elevate its level. The 3 agonists did not influence the plasma levels of epinephrine, an index of adrenomedullary release of catecholamines. Finally, exogenous administration of ET doubled its plasma levels, while Ang II and NE had no effect.

Fig. 1. Effect of exogenous Ang II (a), NE (b) and ET-1 (c) on protein synthesis in small mesenteric arteries. The agonists were studied alone or in association with antagonists of AT_1 receptors (irbesartan, IRB), α -adrenoceptors (prazosin, PRZ) and ET_A receptors (darusentan, DAR). The same control (CTL) rats served for Ang II and NE (n = 8), while ET had different controls (n = 6). ^a p < 0.05 as compared to control values and ^b p < 0.05 as compared to the respective agonist (ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons).

Fig. 2. Effect of exogenous Ang II (a), NE (b) and ET-1 (c) on protein synthesis in the aorta. The agonists were studied alone or in association with antagonists of AT_1 receptors (irbesartan, IRB), α -adrenoceptors (prazosin, PRZ) and ET_A receptors (darusentan, DAR). The same control (CTL) rats served for Ang II and NE (n = 8), while ET had different controls (n = 6). ^a p < 0.05 as compared to control values and ^b p < 0.05 as compared to the respective agonist (ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons).

Discussion

In this study, we explored early growth interactions between the RAS, SNS and ET system, using an in vivo model of protein synthesis measurement. From our results, it appears that the aorta and small mesenteric arteries use a different pattern of local recruitment for their protein synthesis regulation. In resistance arteries, the RAS seems to be upstream in the cascade of interactions, activating the local SNS, which, in turn, triggers the release of ET to produce protein synthesis. However, in conduit arteries, the local SNS appears to be the final system dictating the growth process.

Small Arteries

Vascular hypertrophy of resistance arteries has been described following chronic Ang II stimulation, and this effect is at least partly pressure independent [4, 12, 22]. Hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMC) requires an acceleration of protein synthesis, and our results confirm our previous reports of enhanced protein synthesis after 24 h of stimulation with Ang II in vivo [8, 9]. As expected, the effect of Ang II was inhibited by irbesartan, a selective antagonist of AT_1 receptors [23]. However, the effect of Ang II was also completely inhibited by antagonists of α -adrenoceptors and ET receptors in vivo, suggesting that these systems were recruited to accelerate protein synthesis. Interactions between Ang II and the SNS are well known, and of particular relevance is the amplifying effect of Ang II on NE release by sympathetic fibers [24]. Our simple evaluation of NE spillover by measurement of its circulating levels suggests that Ang II could cause a local facilitation of NE release, although the elevation did not reach significance. Nonetheless, the blockade of protein synthesis by prazosin strongly supports a role of NE in the in vivo action of Ang II in small mesenteric arteries.

Ang II has also been reported to enhance the production of ET by endothelial cells [25] and VSMC [26]. This translates into elevation of vascular concentrations of ET during chronic Ang II administration [12]. Our results confirm that the plasma levels of the peptide do not increase following Ang II administration [27], most probably since the release of ET is preferably abluminal [28]. In chronic conditions *in vivo*, an ET receptor antagonist totally prevented the vascular hypertrophy elicited by Ang II [12]. Thus, our present results in an earlier phase are in agreement with this longer study by showing that Ang II requires the involvement of ET to trigger protein synthesis in the wall of small mesenteric arteries.

Twenty-four hours of NE administration lead to a marked elevation of protein synthesis in small mesenteric arteries. These new results are in line with our previous study showing that chronic exogenous NE administration leads to hypertrophic remodeling of small arteries [10]. The response has been attributed to α -adrenergic stimulation [10, 29], which was confirmed in this study. Furthermore, we have previously reported that blockade of ET receptors blunts the development of hypertrophy induced by NE [10]. Again, these results obtained in chronic conditions were reproduced in our acute model, whereby darusentan prevented NE-induced elevation of protein synthesis. In spite of the fact that we did not observe an enhancement of plasmatic ET concentrations, it is possible that the tissue concentrations of ET were augmented, thus explaining the prevention of hypertrophy in mesenteric arteries with the ETRA. Indeed, catecholamines can acutely stimulate the release of ET by cultured endothelial cells [30] and in vascular [10] and ventricular tissue [31] *in vivo*.

Irbesartan, the AT₁ receptor antagonist, was unable to blunt the accelerated protein synthesis produced by NE stimulation. These results, combined with those obtained with Ang II as the agonist and prazosin as the antagonist, suggest that NE operates downstream of Ang II. Apparently, few studies have looked at the implication of the RAS in NE-induced vascular hypertrophy in resistance arteries, and our results suggest that a local RAS system would not be activated in the control of hypertrophy during SNS activation. Furthermore, since PRA was not changed following NE administration, the circulating RAS was clearly not activated. Considering that the local vascular renin activity was reported to be dependent on circulating renin [32], it is consistent with a lack of local RAS activation.

Although many studies have observed a participation of ET in vascular remodeling, few publications have stud-

ied vascular remodeling following exogenous ET administration. Preliminary results in our laboratory suggest that chronic ET administration at the same dosage for 28 days leads to small artery hypertrophy (cross-sectional area in calcium-free perfused and pressurized conditions: $26.4 \pm 2.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs. control: $11.7 \pm 1.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$ [Dao and Moreau, 2002, unpubl. observations]). In line with those results, 24 h of exogenous ET enhanced protein synthesis in mesenteric arteries, which was blunted only by the ETRA. Although antagonists of the RAS and SNS tended to have an inhibitory effect, it did not reach significance. Furthermore, the lack of changes in PRA and circulating NE level suggests that the systems were not globally affected at the dose of ET used in this study. Thus, ET does not seem to require a significant involvement of the RAS or of the SNS to accelerate protein synthesis in small arteries.

Overall, our results point to a linear type of interaction in the control of protein synthesis in small arteries, whereby Ang II recruits NE that in turn requires ET. Thus, in pathological conditions characterized by the activation of one or several regulatory systems, ET would represent a key mediator of small artery hypertrophy, at least in the early phase of the disease process.

Conduit Arteries

Ang II stimulation enhanced aortic protein synthesis, which is in line with the observation of vascular wall hypertrophy in chronic conditions [6, 7]. Similarly to the results presented for mesenteric arteries, Ang-II-stimulated vascular protein synthesis implicated NE and ET-1 in the aorta as well, since their specific antagonists significantly blunted the response. Catecholamines, through α -adrenoceptors, have been shown to contribute to the mitogenic effect of Ang II in conduit arteries *in vivo* [33]. This could help to resolve the discrepancy that Ang II mainly acts as a trophic factor *in vitro* [34, 35], but could induce hyperplasia (or at least polyploidy) *in vivo* [7], since the final effect would be carried out by the SNS. Indeed, chronic NE administration leads to aortic hyperplasia [11].

Prazosin, an α -adrenoceptor antagonist, was the only treatment to prevent NE-induced enhancement of protein synthesis in the aorta. Indeed, treatment with an AT₁ antagonist or an ETRA had no effect on the response to NE. The results with the ETRA contrast with those obtained in small arteries and suggest a different local interaction between the 3 systems. Interestingly, we reported in a previous study that an ETRA reversed chronic NE-induced aortic hyperplasia of the aortic vascular wall

[11]. However, the same antagonist was unable to prevent the development of hyperplasia [Dao and Moreau, unpubl. observations], suggesting that ET may have a role in the maintenance of hyperplasia (potentially by limiting apoptosis) but not in its development in large arteries.

The effect of exogenous ET on aortic protein synthesis was more modest than that of NE and Ang II. The difference could be attributable to the site of ET administration (intraperitoneal vs subcutaneous) that was chosen to observe enhanced mesenteric protein synthesis reliably with this peptide. Indeed, subcutaneous administration of the same suppressor dose of ET had no significant effect on protein synthesis (aortic and mesenteric), potentially due to poorer diffusion and/or important systemic metabolism. Both an AT₁ receptor and an α -adrenoceptor antagonist significantly prevented this elevation of protein synthesis, in contrast to the results presented in small arteries. This observation suggests an involvement of the local RAS and SNS with exogenous ET administration, as PRA and circulating NE levels were not modified. It is not clear by which mechanism ET could activate those systems locally. It has been suggested that angiotensin-converting enzyme activity increased after the addition of ET-1 to VSMC in culture [36]. It is also possible that voltage-operated calcium channels were activated by exogenous ET and amplified the biological effects of NE and Ang II, as it was proposed for NE-induced vasoconstriction [37, 38]. Whatever the mechanisms, they would have to be selective for conduit arteries to explain the difference between the two vascular beds.

To summarize our observations in conduit arteries, the local interactions regulating protein synthesis in the aorta appear to point to the local SNS as the central effector. Interestingly, Ang II and ET show mutual positive interactions to induce protein synthesis through SNS activation, suggesting a more complex scheme of relationships than in smaller arteries.

Hemodynamic Influences

Increase in pressure is known to activate signaling cascades that could lead to protein synthesis, in addition to a direct effect of the agonists used [39]. It was clearly not the case for NE and ET that did not produce significant pressure changes. Interestingly, Mortensen et al. [18] have previously shown that 5 pmol/kg/min of ET-1 elevates arterial pressure by 20–25 mm Hg, but the peptide was administered intravenously and not intraperitoneally as in this study. Ang II significantly elevated pressure, and this mechanism could have contributed to enhance vascular protein synthesis, although several reports have sug-

gested pressure-independent modulation of remodeling by Ang II [4, 12, 22, 40].

Antagonists could also influence protein synthesis indirectly by reducing arterial pressure. Interestingly, irbesartan reduced pressure in NE-treated rats but was without significant effect on NE-induced protein synthesis. In addition, the significant effect of prazosin and darusentan on Ang-II-induced protein synthesis does not appear to be related to blood pressure lowering, which was not significant for darusentan and borderline for prazosin. It must be noted, however, that pressure was measured only in the aorta and not at the level of small mesenteric arteries, thus weakening our interpretation in this vascular bed.

Conclusion

In this study, we evaluated the early events of vascular hypertrophy/hyperplasia by measuring changes of protein synthesis following 24 h of Ang II, NE or ET stimulation. The results presented are in complete agreement with observations from chronic studies, when available, suggesting that the model is a good predictor of long-term vascular remodeling. Accordingly, stimulation with Ang II, NE or ET enhanced vascular protein synthesis in small mesenteric and conduit arteries. The flexibility of this *in vivo* model allowed us to study specific interactions in the control of vascular remodeling simultaneously in two types of arteries. Agonists mimicked activation of endogenous systems as in pathological conditions, while antagonists blocked the endogenous contribution of the systems. Different schemes of interaction between the RAS, the SNS and ET appear to exist between small and conduit arteries. Indeed, among the 3 agonists, ET seems to be the downstream effector in small arteries, with other agonists feeding at different levels of the cascade: Ang II more upstream and NE intermediate. In conduit arteries, Ang II and ET interact mutually and require the involvement of NE to induce protein synthesis. The reason for the heterogeneity is not clear but may be related to a different composition of the vascular wall, as our evaluation did not dissect out the effect in the 3 vascular tunicae. In fact, since the adventitia can also contribute to the global remodeling, our overall assessment of vascular protein synthesis may better predict final hypertrophic remodeling than studying VSMC alone. Our results also imply that the more downstream a system is, the more chances its antagonist will have to prevent vascular hypertrophy if several systems are activated in pathological conditions.

One limitation of our study is that the experiments performed in the early stage of remodeling do not allow differentiating future hypertrophy from hyperplasia. Indeed, this information normally requires long-term studies to determine cell number and have been performed for most agonists. In fact, the tendency for large arteries to demonstrate hyperplasia and of small arteries to show hypertrophy with these agonists may be related to the distinct downstream effector identified in this study: NE in conduit and ET in small arteries. Considering the numerous clinical conditions showing activation of one or more of

the systems, the interactions reported provide the necessary background work to study the molecular mechanisms involved in protein synthesis, by using relevant downstream agonists in different vascular beds.

Acknowledgements

We thank Mrs. Louise Ida Grondin and Sanaë Yamaguchi for their excellent technical assistance. This work was supported by grants from Knoll AG, Germany, and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.M. is a scholar from the CIHR.

References

- Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330:1431-1438.
- Hamet P, de Blois D, Dam T-V, Richard L, Teiger E, Tea B-S, Orlov SN, Tremblay J: Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74: 850-861.
- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension: Dual process of remodelling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-397.
- Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-635.
- Su EJ, Lombardi DM, Wiener J, Daemen MJ, Reidy MA, Schwartz SM: Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998;82:321-327.
- Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P: Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 1996;28:153-158.
- Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-456.
- Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S: EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C446-455.
- Martens FMAC, Demeillers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, de Blois D, Moreau P: Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition (role of extracellular signal-regulated kinases 1/2). *Hypertension* 2002;39:16-21.
- Dao HH, Martens FMAC, Larivière R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens* 2001;19:1-12.
- Dao HH, Lemay J, de Champlain J, de Blois D, Moreau P: Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelium-dependent. *J Hypertens* 2001; 19:1965-1973.
- Moreau P, d'Uscio L, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: Reversal by ET-A receptor antagonist. *Circulation* 1997;96:1593-1597.
- Park JB, Schiffrin EL: Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: Role of endothelin-1. *Am J Hypertens* 2002;15:164-169.
- Intengan HD, He G, Schiffrin EL: Effect of vasopressin antagonism on structure and mechanics of small arteries and vascular expression of endothelin-1 in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension* 1998;32:770-777.
- Dao HH, Moreau P: An update on the status of endothelin receptor antagonists for hypertension. *Expert Opin Invest Drugs* 2001;10:1937-1946.
- Herizi A, Jover B, Bouriquet N, Mimran A: Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension* 1998;31:10-14.
- Sharifi AM, Schiffrin EL: Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: Effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens* 1997;15:1441-1448.
- Mortensen LH, Pawloski CM, Kanagy NL, Fink GD: Chronic hypertension produced by infusion of endothelin in rats. *Hypertension* 1990;15:729-733 (published erratum appears in *Hypertension* 1990;16:212).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- Yamaguchi N: In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by non-nicotinic mechanism: Local medullary effect of VIP. *Am J Physiol* 1993;265:R766-R771.
- Larivière R, Lebel M, Kingma J, Grose JH, Boucher D: Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 1998;11:989-997.
- Simon G, Illyes G: Structural vascular changes in hypertension: Role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension* 2001;37:255-260.
- Herbert JM, Delisee C, Dol F, Schaeffer P, Cazaubon C, Nisato D, Chatelain P: Effect of SR 47436, a novel angiotensin II AT1 receptor antagonist, on human vascular smooth muscle cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 1994;251:143-150.
- Costa M, Majewski H: Facilitation of nor-adrenaline release from sympathetic nerves through activation of ACTH receptors, β -adrenoceptors and angiotensin II receptors. *Br J Pharmacol* 1988;95:993-1001.
- Imai T, Hirata Y, Emori T, et al: Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992;19: 753-757.
- Hahn AW, Resink TJ, Scott BT, et al: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: A novel autocrine function. *Cell Regul* 1990;1:649-659.
- d'Uscio L, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997;29:435-441.
- Wagner O, Christ G, Wojta J, et al: Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:16066-16068.

- 29 de Blois D, Schwartz SM, van Kleef EM, Su JE, Griffin KA, Bidani AK, Daemen MJAP, Lombardi DM: Chronic alpha1-adrenoreceptor stimulation increases DNA synthesis in rat arterial wall. *Arteriol Thromb Vasc Biol* 1996;16:1122-1129.
- 30 Prasad MR, Jones RM, Kreutzer DL: Release of endothelin from cultured bovine endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:655-658.
- 31 Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA: Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. *Circulation* 1996;93:2068-2079.
- 32 Taddei S, Virdis A, Abdel-Haq B, et al: Indirect evidence for vascular uptake of circulating renin in hypertensive patients. *Hypertension* 1993;21:852-860.
- 33 van Kleef EM, Smits JF, De Mey JG, Cleutjens JP, Lombardi DM, Schwartz SM, Daemen MJ: Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ Res* 1992;70:1122-1127.
- 34 Holycross BJ, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II stimulates increased protein synthesis, not increased DNA synthesis, in intact rat aortic segments, in vitro. *J Vasc Res* 1993;30:80-86.
- 35 Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62:749-756.
- 36 Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T: Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 1996;27:463-465.
- 37 Yang Z, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF: Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. *Circulation* 1990;82:188-195.
- 38 Wong-Dusting HK, La M, Rand MJ: Mechanism of the effects of endothelin on responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990;17:269-273.
- 39 Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook N: Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996;97:508-514.
- 40 Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM: Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 1998;31:1331-1337.

Erratum

Notification to a Prior Publication

A previously published paper by Sanchez de Miguel et al. [*J Vasc Res* 1999;36:201-208] contains a figure (i.e. fig. 1) which has been identically published in several other journals [Alonso et al.: *Mol Cell Biol* 1997;7:5719-5726; Jiminez et al.: *Circulation* 2001;104:1822-1830 and Arriero et al.: *Circ Res* 2002;90:719-727]. In these different publications, the origin of the vascular material was reported differently: bovine aortic endothelial cells [Alonso et al., Sanchez de Miguel et al.], rabbit aorta [Jiminez et al.] and guinea pig pericardium [Arriero et al.].

This is a clear violation of the prior publication policy for *JVR* and of common scientific and ethical standards. Editorial sanctions have been imposed by *JVR* after an investigation that included a request for an explanation by the senior author of all these publications, Dr. A. López-Farré.

Ulrich Pohl, Munich

Position of Src tyrosine kinases in the interaction between angiotensin II and endothelin in *in vivo* vascular protein synthesis

Pierre Beaucage^a, Marc Iglarz^b, Marc Servant^a, Rhian M. Touyz^b and Pierre Moreau^a

Objectives Endothelin is a necessary intermediate in the trophic action of angiotensin II during hypertension-induced resistance artery remodeling *in vivo*. Since Src tyrosine kinases can be activated by both agonists, we studied their role in the trophic action of angiotensin II, endothelin and their interaction in rat small mesenteric arteries.

Methods and results Twenty-six hour infusion of high-dose angiotensin II (400 ng/kg per min) or endothelin (5 pmol/kg per min) via osmotic pumps significantly enhanced vascular protein synthesis *in vivo*. When angiotensin II was used as the trophic stimulus, treatment with a Src tyrosine kinase inhibitor (PP2, 0.5 mg/kg, starting at 21 h of the 26-h stimulation) produced a significant attenuation of extracellular regulated kinase 1 (ERK 1) phosphorylation and of protein synthesis. However, PP2 administered at 21 h or throughout the 26-h infusion did not abrogate the elevation of protein synthesis induced by endothelin. Moreover, endothelin did not enhance the phosphorylation of ERK 1/2 in small mesenteric arteries. We confirmed that angiotensin II stimulated the expression of prepro-endothelin mRNA in small mesenteric arteries in a Src-dependent manner, as the response was inhibited by PP2. To support the specific inhibitory activity of PP2 on Src tyrosine kinases *in vivo*, angiotensin II-induced phosphorylation of cortactin, a Src-specific substrate, was inhibited by PP2.

Conclusion Src tyrosine kinases represent an important signaling element in angiotensin II-induced endothelin production in small arteries *in vivo*. However, Src tyrosine kinases did not appear to contribute to the trophic signaling of endothelin, suggesting that they lie upstream of endothelin in the angiotensin II-endothelin-protein synthesis cascade. *J Hypertens* 23:329–335 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Journal of Hypertension 2005, 23:329–335

Keywords: angiotensin II, endothelin-1, vascular remodeling, Src tyrosine kinases, hypertrophy, ERK 1/2

^aFaculté de pharmacie, Université de Montréal and ^bInstitut de recherche clinique de Montréal (IRCM), Quebec, Canada.

Sponsorship: This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.B. received a stipend from Canadian Hypertension Society/CIHR. M.I. is a fellow of the Fondation pour la Recherche Médicale (France). R.M.T., M.S. and P.M. are scholars from CIHR/Canadian Hypertension Society, FRQS and CIHR, respectively.

Correspondence and requests for reprints to Pierre Moreau, Ph.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, PO Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7.
Tel: +1 514 343 6111 (3342); fax: +1 514 343 2102;
e-mail: [REDACTED]

Received 7 January 2003 Revised 21 July 2004
Accepted 10 September 2004

Introduction

The renin-angiotensin system (RAS) is an important stimulus of vascular hypertrophy, and such a response has been observed by several research groups using chronic *in vivo* administration of angiotensin II (Ang II) [1–4]. We have previously reported that Ang II-induced small artery hypertrophy was prevented by an endothelin receptor antagonist (ETRA) [3], suggesting an obligatory involvement of endothelin (ET) in the vascular trophic action of Ang II *in vivo*. We recently confirmed this finding using an acute *in vivo* model of vascular hypertrophy, in which 24 h of Ang II stimulation produced a significant increase of small artery protein synthesis rate that was totally prevented by an ETRA [5]. The interaction between the RAS and the ET system is not limited to small artery hypertrophy, suggesting that

the two systems cooperate locally to modulate several vascular responses [6].

Signal transduction pathways underlying Ang II-stimulated vascular hypertrophic remodeling are gaining in complexity [7]. Many studies report Ang II activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases, in vascular smooth muscle cells (VSMCs), suggesting a potential contribution of this signaling pathway to Ang II-induced vascular remodeling [8,9]. Among MAP kinases, extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 were proposed to be essential in Ang II effects [10]. Mechanisms linking Ang II-receptor stimulation to ERK 1/2 activation are under intensive investigation. Among the candidates, it is proposed that non-receptor tyrosine kinases, such as the Src family, could play an important role in Ang II-stimulated

VSMC growth via ERK 1/2 [8,11–13]. Indeed, Src tyrosine kinases are rapidly activated by Ang II stimulation [14]. Among the Src kinase family, c-SRC appears to be the major isoform in the vascular wall [15], and seems to be involved in contraction [16], proliferation [17], growth [12] and cytoskeletal reorganization [18].

Interestingly, Ang II and ET share similar signaling pathways. Indeed, in both cardiomyocytes and VSMCs, ERK 1/2 signaling is involved in regulating ET expression [19] and ET-induced cell growth [20,21]. Moreover, recent studies suggest a role for non-receptor tyrosine kinase, such as Src, in ET-induced ERK 1/2 activation [22] and ET-induced cardiomyocyte hypertrophy [23].

Considering the emerging role of Src family kinases in cellular processes induced by G-protein-coupled receptors, and the significant interaction between Ang II and ET *in vivo*, our first objective was to determine the involvement of Src tyrosine kinases in Ang II- and ET-induced vascular protein synthesis, and thus their position in the interaction between the two systems. Secondly, we examined the phosphorylation of ERK 1/2 during Ang II- and ET-induced protein synthesis in small mesenteric arteries *in vivo*. The selection of an *in vivo* model relies on the fact that little is known about the contribution of these signaling cascades in the pathological context of vascular remodeling. Moreover, the interaction between Ang II and ET is likely to be more significant *in vivo*, where the vascular layers are intact, thus providing a better model to study signaling in that context.

Materials and methods

In total, 94 male Sprague–Dawley rats (300–325 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). At least 2 days after arrival, animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) and two catheters (short PE10 segment welded to an extravascular PE50 segment) were inserted; one into the femoral artery and the other in the vein. The catheters were tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected with a tethering system. To study Ang II- and ET-induced vascular protein synthesis, osmotic pumps (model 1003D Alzet; Durect, Cupertino, California, USA), releasing a constant dose of Ang II (400 ng/kg per min, s.c., $n = 41$) [24] or ET-1 (5 pmol/kg per min, i.p., $n = 30$) [5], were implanted for 26 h. We selected doses of Ang II and ET-1 based on pilot studies showing reproducible stimulation of vascular protein synthesis. Control rats were sham-operated ($n = 23$), knowing that implanting saline-filled pumps did not modify protein synthesis. In subgroups of control, Ang II- and ET-treated rats, PP2 (0.5 mg/kg i.v., a specific inhibitor of Src activity) was administered 5 h before sacrifice of the animal. Dosage of PP2 was based on a pilot study in which its effect was minimal on blood pressure

but maximal on Ang-stimulated vascular protein synthesis. The administration time of PP2 was selected in relation to leucine infusion. In rats used for the quantification of vascular protein synthesis, an i.v. L-[4,5-³H]leucine infusion was started 22 h after the implantation of the osmotic pumps and was continued for a period of 4 h at a rate of 12 μ Ci/h. Thus, in order to evaluate the role of Src tyrosine kinases in Ang- or ET-induced vascular protein synthesis, we administered PP2 1 h before the leucine infusion (5 h before sacrifice), as we reported previously for other drugs affecting signal transduction mechanisms [25]. In another subset of ET-treated rats, PP2 was administered at 8-h intervals (0.5 mg/kg, i.v.), starting with the implantation of the osmotic pump. The same experiment was not done in the Ang II-treated rats, because PP2 inhibited protein synthesis when administered during the last 5 h, making a longer inhibition period unnecessary. Hemodynamic parameters were measured by the intra-arterial catheter in awake rats during the last 4 h of treatment, before sacrifice. All protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

Protein synthesis measurement

Following leucine infusion, animals were sacrificed by anesthesia and small mesenteric arteries (arteries branching from the superior mesenteric artery, from approximately 350 to less than 100 μ m internal diameter) were harvested and frozen at -80°C . Vascular protein synthesis measurement was performed according to a protocol detailed in previous publications [5,24,25]. Results are expressed as cpm/mg of proteins and represent the protein synthesis rate over a period of 4 h.

PreproET-1 mRNA levels in mesenteric arteries

Expression of the ET-1 gene in mesenteric arteries was studied by reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR). Reverse transcription was done in 20 μ l containing 1 μ g RNA, 1.5 μ l of 10 mmol/l deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 6 μ l of 5 \times first-strand buffer [250 mmol/l Tris–HCl (pH 8.3) 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl_2], 0.6 μ l of oligo-(dT)_{12–18} primer (0.5 μ g/ μ l), 1.5 μ l of 200 U/ μ l Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (all from Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 0.9 μ l of rRNasin (RNase inhibitor; 40 U/ μ l), and 3 μ l of dithiothreitol (0.1 mol/l) for 1 h at 37°C . The reaction was stopped by heating at 95°C for 5 min. Two microliters of the resulting complementary DNA (cDNA) mixture was amplified using specific primers. For amplification of ET gene cDNA, sense 5'-TGC TCC TGC TCC TTG AT-3' and antisense 5'-CAC CAC GGG GCT CTG TAG TC-3' primers were used. For glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), sense 5'-TAT GAT GAC ATC AAG GTG-3' and antisense 5'-CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3' primers were used. PCR was conducted with an initial denaturing interval (95°C , 5 min) and then

30 sequence cycles for prepro-ET-1: 94°C (45 s), 60°C (30 s), and 72°C (30 s), and for GAPDH: 94°C (45 s), 57°C (30 s), and 72°C (30 s). Amplification products were electrophoresed on 1% agarose gels containing ethidium bromide (0.5 µg/ml). Bands corresponding to RT-PCR products were visualized by UV light and digitized using AlphaImager software (Alpha Innotech Corp., San Leandro, California, USA). Band intensity was quantified using the ImageQuant software (version 3.3; Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA).

Western blotting for ERK 1/2

Proteins were extracted from small mesenteric arteries harvested as described above. The procedure for the Western blotting is described in detail elsewhere [26]. The antibodies used were a phospho-specific ERK 1/2 antibody (1 : 2000, Cell Signaling Technologies, Beverly, Massachusetts, USA) and an anti-ERK 1/2 (1 : 1000, Cell Signaling Technologies). Immunoreactive bands were revealed and quantified by chemiluminescence with Chemiglow reagents and Chemi-Imager 5500 (CGW-80SK; Alpha Innotech Corp.).

Immunoprecipitation and immunoblot analysis of cortactin

To analyze the state of cortactin phosphorylation, whole cell extract (200 µg) prepared in NP-40 lysis buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l sodium fluoride, 5 mmol/l EDTA, 40 mmol/l β-glycerophosphate, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 10⁻⁴ mol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ mol/l leupeptin, 10⁻⁶ mol/l pepstatin A, 1% NP-40 buffer) were incubated for 3 h at 4°C with anti-cortactin (Upstate Technologies, Lake Placid, New York, USA) antibody and the immune complexes were collected with protein A-Sepharose beads (Amersham Biosciences). The beads were washed five times with NP-40 buffer, resuspended in denaturing sample buffer, and the eluted proteins were analyzed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibodies. Briefly, eluted proteins were subjected to electrophoresis on 7.5% acrylamide gels. The proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) in 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycine and 20% methanol. The membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20 for 1 h at 25°C before incubation for 2 h at 25°C with a monoclonal antiphosphotyrosine antibody mix consisting of 4G10 (0.33 µg/ml; Upstate Technologies) and PY99 (0.2 µg/ml; Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA) in Tween Tris-buffered saline (TTBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA). After washing four times in TTBS, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 10 000) in blocking solution. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence.

Membranes were stripped in a solution of 0.06 mol/l Tris (pH 6.8), 2% sodium dodecylsulfate (SDS) and 0.7% 2-mercaptoethanol, washed in TTBS, blocked with 5% non-fat dry milk, washed again with TTBS and blotted with an anti-cortactin mouse monoclonal antibody (2 µg/ml; Upstate Technologies). Immunoreactive bands were quantified by chemiluminescence as described above.

Drugs and statistical analyses

Ang II was obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), while ET and PP2 were purchased from Calbiochem (LaJolla, California, USA). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was done by a one-way analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* comparisons, selected a priori and performed using Bonferroni's correction, were Ang II and ET groups compared to controls, and Ang + PP2 and ET + PP2 groups compared to their respective controls (Ang II or ET alone). Differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

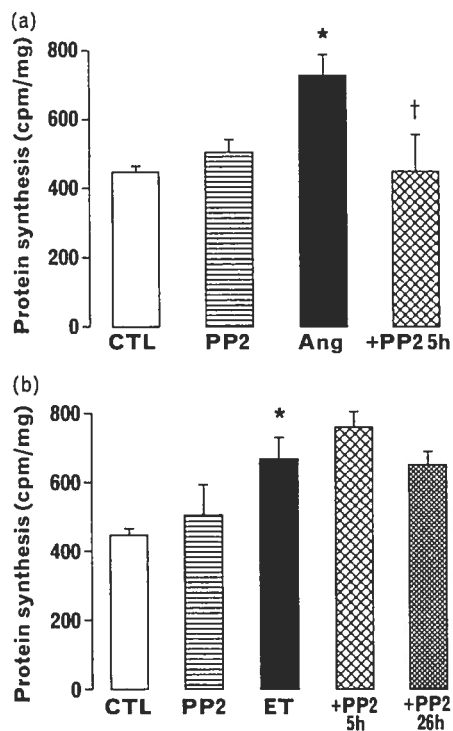
Results

In mesenteric arteries, the basal protein synthesis rate was 447 ± 18 cpm/mg, and did not change following PP2 treatment. However, Ang II infusion increased the rate of protein synthesis by 63%. In the first set of experiments, in which PP2 was administered 5 h before harvesting the vessels, PP2 blunted the effect of Ang II and normalized protein synthesis (Fig. 1a). Exogenous infusion of ET induced a significant elevation of protein synthesis (increase of 49% from control values). However, administration of PP2 either acutely (5 h) or throughout the 26 h of ET administration did not prevent the effect of ET on protein synthesis rate (Fig. 1b).

To confirm the interaction between Ang II and ET under our conditions, quantification of prepro-ET mRNA was performed in mesenteric arteries. The optical density ratio of prepro-ET/GAPDH was significantly augmented in the presence of Ang II infusion, as compared to control values. Treatment with PP2 significantly attenuated Ang II-induced mRNA expression of prepro-ET (Fig. 2). To confirm that PP2 inhibited Src tyrosine kinases *in vivo* at the dose selected, we evaluated, as previously reported [27], tyrosine phosphorylation of a Src-specific substrate, cortactin, after its immunoprecipitation. As shown in Figure 3, Ang II stimulation produced a clear phosphorylation of cortactin, which was blunted by PP2. As a positive control, we used platelet-derived growth factor (PDGF)-stimulated VSMCs [28].

In mesenteric arteries, ERK 1 phosphorylation increased significantly after Ang II infusion, and this was abrogated by PP2 treatment (Fig. 4). Interestingly, ERK 2 phosphorylation was not affected by Ang II infusion and by PP2. Infusion of ET did not significantly enhance ERK 1/2 phosphorylation. Surprisingly, PP2 administered with

Fig. 1



(a) Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from control rats (CTL), rats treated for 26 h with angiotensin II (Ang) alone, for 5 h with PP2 alone, or with a combination of both treatments (+PP25 h). (b) Similar measurements in rats treated for 26 h with endothelin (ET) alone or with PP2 administered during the last 5 h of its infusion (+PP25 h), or throughout its infusion (+PP226 h). * $P < 0.05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

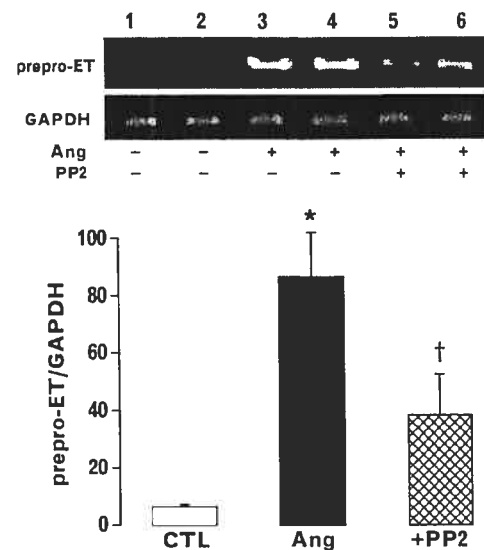
ET had a tendency to enhance ERK1/2 phosphorylation. Similar results, in the presence of Ang II or ET stimulation, were obtained with 24-h Src inhibition (data not shown).

Administration of the Src family inhibitor PP2 alone did not modify heart rate (HR) or diastolic (DBP), systolic (SBP) or mean (MBP) blood pressure (Table 1). Following 26 h of Ang II stimulation, DBP, SBP and MBP were augmented, as compared to the control group. Addition of PP2 to Ang II stimulation did not modify pressure values significantly, although SBP tended to increase. The administration of exogenous ET-1 alone or with PP2 had no significant effect on pressure.

Discussion

Intracellular signaling mechanisms underlying Ang II-dependent growth of VSMCs have been explored extensively recently [7]. ET-1 has been implicated in the mediation of some of the actions of Ang II, as demonstrated in *in vivo* and *in vitro* studies [6]. However, few

Fig. 2

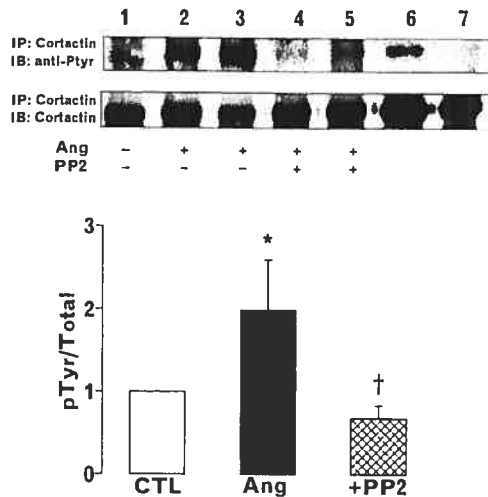


Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of prepro-endothelin (prepro-ET) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) in small mesenteric arteries from control (CTL; lanes 1 and 2), angiotensin II-treated (Ang; lanes 3 and 4) and Ang plus PP2-treated rats (lanes 5 and 6). The chart represents the ratio of prepro-ET on GAPDH. See legend of Fig. 1 for duration of treatments. * $P < 0.05$ as compared to CTL, † $P < 0.05$ as compared to Ang or ET. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

studies have attempted to determine the position of key signaling elements relaying the interaction between Ang II and ET-1. The main finding of our work is that Src tyrosine kinases appear to play a major role in Ang II-stimulated protein synthesis, by allowing the stimulation of prepro-ET mRNA expression. Furthermore, this family of non-receptor tyrosine kinases was not involved in ET-induced vascular protein synthesis, confirming an upstream rather than a downstream position in relation to ET. Our findings also suggest that ERK1/2 may be positioned upstream of ET, but downstream of Src family kinases, in the cascade leading to *in vivo* protein synthesis in small mesenteric arteries.

Although Src kinases have been reported to mediate some of the effects of Ang II *in vitro* [12–14,27], we provide evidence that it also occurs *in vivo* in the trophic action of Ang II in small mesenteric arteries. Indeed, PP2 produced a striking inhibition of Ang II-induced vascular protein synthesis. We confirmed that at the dose selected, PP2 inhibited the phosphorylation of cortactin, which is a substrate of Src tyrosine kinases. Although this result does not prove that PP2 did not have non-specific effects to reduce protein synthesis, it is consistent with results obtained *in vitro* [27]. Moreover, the lack of effect of PP2 during ET-induced protein synthesis also suggests that PP2 did not have unspecific effects. It has been suggested

Fig. 3

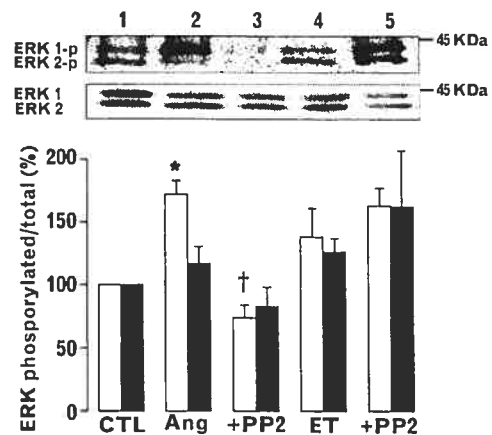


Phospho-tyrosine (pTyr) immunoblot after immunoprecipitation with a cortactin antibody in mesenteric arteries from control (CTL; lane 1), angiotensin II-treated (Ang; lanes 2 and 3) and Ang + PP2-treated rats (5 h of inhibition, lanes 4 and 5). The next lanes represent control experiments using unstimulated vascular smooth muscle cells (VSMC; lane 7) or VSMC stimulated with 50 ng/ml platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) for 10 min (lane 6). The membrane was stripped and reblotted with an anti-cortactin antibody to show the total amount of cortactin in the samples after immunoprecipitation (second blot). The chart represents the relative ratio of phosphorylated cortactin on total cortactin, as compared to the control ratio. * $P < 0.05$ as compared to the CTL value of 1 (one sample analysis), † $P < 0.05$ as compared to Ang alone (unpaired *t*-test).

that c-Src, a member of the Src tyrosine kinase family, is rapidly phosphorylated in the presence of Ang II stimulation in VSMC [14]. In fact, c-Src appears to be the major isoform of Src tyrosine kinases in the vasculature [15,29]. However, identification of the family member mediating the effect of Ang II was beyond the scope of our work. In addition to Src activation, we confirmed *in vivo* the results of several *in vitro* studies reporting that Ang II stimulation activates ERK in VSMC [9,10,12,29]. However, only ERK 1 was significantly phosphorylated under our conditions. The significance of this result is not known. We also present evidence that Ang II-induced ERK 1 phosphorylation is Src-dependent *in vivo*. These results are in line with previous observations in cultured VSMC, in which a similar effect of PP2 on Ang II-induced ERK 1/2 phosphorylation was reported [12]. Moreover, Ishida *et al.* [29] demonstrated that overexpression of a dominant negative c-Src significantly inhibited Ang II-stimulated ERK 1/2 phosphorylation in rat VSMC.

Previous publications have shown that prepro-ET expression is enhanced after Ang II stimulation in endothelial and VSMC [30,31]. Our data demonstrating enhanced prepro-ET expression with Ang II *in vivo* is in line with these *in vitro* studies. Although in the present study vascular ET levels were not measured, other *in vivo*

Fig. 4



Representative pictures of Western blot analysis of extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 with a phospho-specific antibody (ERK 1-p, ERK 2-p) or a anti-ERK 1/2 antibody (total protein). Lanes 1 to 5 correspond to the labels underneath the bar chart depicting the average of four experiments (ERK 1: hollow bars; ERK 2: dark bars). Ang, angiotensin II administered for 26 h; ET, endothelin-1 administered for 26 h; PP2, administered as a bolus 5 h before the end of Ang or ET infusion. Similar data were obtained with PP2 administered throughout Ang II and ET administration (not shown). * $P < 0.05$ as compared to control (CTL), † $P < 0.05$ as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

studies reported elevated vascular ET protein levels after chronic Ang II administration [3,32]. The novel finding of the present study is the identification of signaling elements in the induction of prepro-ET expression *in vivo*. Underlying signaling pathways involved in ET production have been poorly investigated both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, thrombin-induced ET overexpression appears to be protein kinase C (PKC)-dependent [33], while Ang II-induced ET expression is mediated by the ERK 1/2 pathway [19]. Our data, obtained under short-term Ang II stimulation, suggest that the Src family of tyrosine kinases are involved in the local production of ET. Indeed, PP2 was able to blunt significantly Ang II-induced overexpression of prepro-ET in small mesenteric arteries. Our results also point to a potential involvement of ERK 1/2 in the same response, although more definite *in vivo* evidence is required.

Table 1 Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	<i>n</i>	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (mmHg)
Control	23	87 ± 2	119 ± 2	97 ± 1	360 ± 13
PP2	2	86 ± 4	124 ± 5	99 ± 3	350 ± 12
Ang II	7	112 ± 6*	138 ± 5*	121 ± 5*	383 ± 10
+PP2	4	109 ± 7	159 ± 11	126 ± 9	350 ± 32
ET-1	6	84 ± 3	121 ± 2	96 ± 2	339 ± 6
+PP2	6	81 ± 3	119 ± 3	94 ± 3	339 ± 7

Values are means ± SEM. *n*, number of rats per group in which hemodynamic measurements were made; control rats were pooled (Ang II, *n* = 12, plus ET study, *n* = 11). DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; HR, heart rate. * $P < 0.05$ as compared to control. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

In contrast to what was observed with Ang II, blockade of Src activity with PP2, either acutely or for the duration of ET administration, did not inhibit ET-induced vascular protein synthesis *in vivo*. Thus, it appears that the Src kinase family is not a signaling element in the cascade leading to ET enhancement of protein synthesis. Our data are not necessarily in contradiction with previous studies that have attributed a role for Src tyrosine kinases in the signaling of ET, as they were performed *in vitro* and in other cell types [22]. The doses used *in vitro* and in the present study may also explain some of the discrepancy. At 5 pmol/kg per min, plasma levels of ET double [5], whereas mesenteric arterial concentrations increase by approximately threefold (Dao *et al.*, unpublished observation). These local concentrations are well within the pathophysiological range, whereas higher concentrations (tenfold) have been reported in human pulmonary hypertension [34]. Our stimulation may thus be smaller than that generally used *in vitro*, but none the less sufficient to induce significant vascular protein synthesis.

As with Ang II, Src tyrosine kinases were reported to act as an intermediate in the activation of ERK 1 by ET in cultured fibroblasts [35]. In our experiments, ET did not increase the phosphorylation of ERK 1/2 in small mesenteric arteries. Although our results are in line with recent *in vitro* work demonstrating that ET increases total ERK 1/2 content, but not their activity, after 120 h of stimulation [36], they are at variance with other reports in cardiomyocytes [37], fibroblasts [35], myometrial cells [22] and VSMC [38]. Thus, the literature is conflicting about ET-induced ERK 1/2 activation. Brehm *et al.* [36] have suggested that variable experimental conditions could explain this discrepancy. Our study in more physiological conditions, using a dose producing a local concentration within the pathophysiological range, may help to clarify the situation, at least in vascular tissues.

Although the present study proposes signal transduction elements involved in the interaction between Ang II and ET on vascular protein synthesis in pathophysiological conditions, our experimental model has some limitations and our results should be interpreted within this context. For instance, it is technically difficult to construct accurate time-response curves, especially at very early time points. To circumvent this limitation, we designed two protocols: one evaluating the effect of PP2 throughout ET administration and the other one, similar to our previous work [25], administering PP2 during the last 5 h of ET stimulation. Since the results were not different between the two series of experiments, we concluded that Src kinases are not contributing to ET-induced protein synthesis either early or late in the process. This is in contrast to the effect of Ang II on the Src kinase family, which appeared to be sustained *in vivo*, since late administration of PP2 (starting 21 h after Ang II

administration) blunted protein synthesis. Although the sustained effect of Ang II is at variance with studies in cultured conditions, where c-Src activation lasted 10 min at most [12,39], it must be emphasized that a bolus of Ang II was administered in cultured conditions, while we used a sustained infusion.

Another limitation of our model is the use of a relatively large dose of Ang II to stimulate vascular protein synthesis. Although smaller doses have been shown to produce vascular hypertrophy [4], we were unable to detect an elevation of protein synthesis with doses smaller than 400 ng/kg per min after 24 h of administration. It is possible that smaller doses produce changes that are too subtle to be detected by our method, or require a longer delay before stimulating protein synthesis. None the less, since the trophic effect of 400 ng/kg per min in acute conditions and 200 ng/kg per min during chronic administration can be blocked by an ETRA, the acute model presented in this manuscript appears relevant to the lower dose chronic model.

Working *in vivo* always brings the potential influence of hemodynamic factors on protein synthesis and cell signaling. It is well established that vascular hypertrophy of resistance arteries is mediated partly by pressure-independent mechanisms *in vivo* [1]. However, elevation of arterial pressure can potentially influence signal transduction pathways involved in protein synthesis [39,40]. In our study, Ang II significantly elevated both arterial pressure and protein synthesis. Since PP2 decreased protein synthesis and ET expression, but did not reduce Ang II-induced increase of blood pressure, our results do not discriminate whether Ang II directly or indirectly (through the elevation of arterial pressure) stimulates ET expression and protein synthesis. A smaller dose of Ang II (200 ng/kg per min, unpublished observation) significantly increased blood pressure but did not enhance protein synthesis, lending support to a direct action of Ang II at higher doses. Moreover, Ang II has been shown repeatedly to stimulate the expression of ET *in vitro* [19]. Conversely, pressure elevation has been shown to enhance Src phosphorylation *in vitro*, although for less than 5 min [39]. None the less, our results suggest that Src tyrosine kinases are not involved in acute blood pressure elevation induced by Ang II and that ET mediates a pressure-independent increase of protein synthesis.

In conclusion, in the present study we evaluated the position of Src tyrosine kinases in the interaction between Ang II and ET in the control of protein synthesis in small arteries, which is an early and robust marker of vascular hypertrophy [5]. Our results show that the Src family of tyrosine kinases are positioned downstream of Ang II, but upstream of ET. Furthermore, our data demonstrate that ERK 1 is phosphorylated in a Src-dependent manner by Ang II, but not by ET, again suggesting that this signaling

element lies upstream of ET. Thus, the results of the present study, performed *in vivo* in a paradigm of vascular remodeling that is relevant to hypertension and its management, positions important signaling elements involved in the control of small artery hypertrophy. This work may help to devise appropriate therapeutic strategies aiming at providing vascular protection in addition to lowering of arterial pressure.

Acknowledgement

We thank Louise Ida Grondin for her excellent technical assistance.

References

- Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991; **17**:626–635.
- Dao HH, Martens FM, Lariviere R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, et al. Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens* 2001; **19**:1801–1812.
- Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 1997; **96**:1593–1597.
- Simon G, Illyes G. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension* 2001; **37**:255–260.
- Beaucage P, Yamaguchi N, Lariviere R, Moreau P. Heterogeneity in the acute control of vascular protein synthesis *in vivo*. *J Vasc Res* 2003; **40**:123–131.
- Moreau P, Laplante MA, Beaucage P, de Champlain J. Angiotensin-endothelin interactions. In: Unger T, Schölkens BA (editors): *Handbook of experimental pharmacology: angiotensin*, Section 1: gene aspects, Vol. 163/I. Berlin: Springer-Verlag; 2004, pp. 149–170.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; **52**:639–672.
- Haendeler J, Berk BC. Angiotensin II mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Regul Pept* 2000; **95**:1–7.
- Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens* 1999; **17**:907–916.
- Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; **271**:16047–16052.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997; **29**:366–373.
- Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 2001; **38**:56–64.
- Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997; **80**:607–616.
- Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; **77**:1053–1059.
- Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; **77**:606–617.
- Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, et al. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2001; **19**:441–449.
- Schwartzberg PL. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 1998; **17**:1463–1468.
- Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahashi M, Berk BC. Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest* 1999; **103**:789–797.
- Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, et al. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004; **61**:159–168.
- Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 1998; **76**:725–746.
- Douglas SA, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res* 1997; **34**:152–164.
- Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **283**:C251–C260.
- Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1998; **273**:35185–35193.
- Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, et al. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002; **39**:16–21.
- Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **283**:C446–C455.
- Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999; **84**:505–515.
- Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002; **39**:479–485.
- Craig AWB, Zirngibl R, Williams K, Cole LA, Greer PA. Mice devoid of *fer* protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2001; **21**:603–613.
- Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; **82**:7–12.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**:411–415.
- Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **271**:429–437.
- Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity *in vivo*: role of ET_A-receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**:861–865.
- Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, et al. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**:2409–2411.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langeden D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; **328**:1732–1739.
- Bisotto S, Fixman E. Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by the type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. *Biochem J* 2001; **360**:77–85.
- Brehm BR, Klausner M, Wolf SC. Chronic elevated endothelin-1 concentrations regulate mitogen-activated protein kinases ERK 1 and ERK 2 in vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Colch)* 2002; **103**(suppl 48):137S–140S.
- Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, et al. Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**:139–150.
- Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999; **140**:4659–4668.
- Rice DC, Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Src autophosphorylation is an early event in pressure-mediated signaling pathways in isolated resistance arteries. *Hypertension* 2002; **39**:502–507.
- Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996; **97**:508–514.

EGF Receptor Transactivation in Angiotensin II and Endothelin Control of Vascular Protein Synthesis in vivo

Pierre Beaucauge and Pierre Moreau

Abstract: Endothelin represents a necessary intermediate of angiotensin II-induced resistance artery remodeling in hypertension. Recent data suggest that epidermal growth factor receptors are rapidly transactivated by angiotensin II stimulation to mediate its growth-promoting effects. Because endothelin also transactivates epidermal growth factor receptors in vitro, we studied the contribution of epidermal growth factor receptor transactivation in the in vivo trophic actions of the upstream effector angiotensin II and its downstream mediator endothelin in rat mesenteric arteries. Twenty-six-hour infusion of angiotensin II (400 ng/kg per min) or endothelin (5 pmol/kg per min) via osmotic pumps significantly enhanced vascular protein synthesis. With angiotensin II, treatment with the inhibitor of epidermal growth factor receptor transactivation (AG1478, 0.5 mg/kg) produced a significant attenuation ($P < 0.05$) of protein synthesis. In contrast, AG1478 did not abrogate the elevation of protein synthesis induced by endothelin. In conclusion, angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor transactivation seems to be involved in the recruitment of endothelin in the cascade leading to vascular protein synthesis, rather than in the effect of endothelin on small artery remodeling.

Key Words: angiotensin II (Ang II), endothelin (ET), epidermal growth factor, hypertrophy, vascular remodeling, hypertension

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2004;44(suppl 1):S20–S23)

The renin–angiotensin system represents an important modulator of vascular remodeling, as exemplified in vivo, in chronic and acute models of angiotensin II (Ang II) administration.^{1–4} In most instances, Ang II-induced remodeling was prevented by endothelin (ET) receptor antagonists, suggesting that the renin–angiotensin system recruits ET to produce the final remodeling effect.^{5–6} This necessary involvement of ET in the trophic action of Ang II was recently confirmed using short-term in vivo evaluation of protein synthesis.⁴

Our understanding of cell signaling used by Ang II to transmit information from the cell surface to the internal cellular environment is gaining in complexity.⁷ Recent advances suggest that Ang II-induced epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation is an early signaling component of Ang II-induced cellular growth in vitro⁸ and in vivo.⁹ Interestingly, ET and Ang II share similar signaling pathways, including EGFR transactivation.¹⁰ In view of the growing importance of EGFR transactivation in cell signaling originating from G protein-coupled receptors, our aim was to determine the involvement of EGFR transactivation in the signaling of ET and Ang II (and their interaction) leading to vascular protein synthesis in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Surgical Procedure and Treatments

Sprague-Dawley rats (300–325 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). Animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) and polyethylene catheters were inserted into a femoral artery and vein. The tubing was then tunneled subcutaneously, exteriorized at the back of the neck and protected by a tethering system.

To study the underlying mechanisms involved in Ang II-induced and ET-induced vascular protein synthesis, a miniature osmotic pump (model 1003D Alzet, Durect, Cupertino, CA, USA) releasing a constant dose of Ang II (400 ng/kg per min, s.c.)¹¹ or ET (5 pmol/kg per min, i.p.)⁴ for 26 hours was implanted in the animal at the time of catheterization. Rats were allowed to recover unrestrained until drug treatment and had free access to food and water. In subgroups, treatment with AG1478 (0.5 mg/kg), a specific EGFR kinase inhibitor, was administered as an intravenous bolus 5 hours before sacrifice of the animal (21 hours after starting Ang II and ET infusion). In rats used for quantification of protein synthesis, an i.v. L-(4,5-³H)leucine infusion was started 1 hour later and lasted for a period of 4 hours (12 μ Ci/h). Rats were then sacrificed by anesthesia and small mesenteric arteries extending from, but excluding, the superior mesenteric artery were harvested and frozen at -80°C . All hemodynamic parameters were measured over the previous 5 hours and these are presented in Table 1. The Animal Care and Use Committee of Université de Montréal approved all protocols.

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Canada
Address correspondence and reprint requests to Dr Pierre Moreau, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, PO Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7. E-mail:

Copyright ©2004 by Lippincott Williams & Wilkins

TABLE 1. Hemodynamic parameters measured in freely moving rats

	n	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (mmHg)
Control	14	87 ± 2	119 ± 2	97 ± 1	360 ± 13
AG 1478	3	89 ± 7	126 ± 5	101 ± 3	382 ± 6
Ang II	7	112 ± 6*	138 ± 5*	121 ± 5*	383 ± 10
+AG1478	3	96 ± 2†	129 ± 5	107 ± 3	382 ± 6
ET-1	6	84 ± 3	121 ± 2	96 ± 2	339 ± 6
+AG1478	6	78 ± 6	122 ± 9	93 ± 6	372 ± 14

Values are means ± SEM. n, number of rats per group in which hemodynamic measurements were made; control rats were pooled (Ang II n = 7, plus ET study, n = 7). DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; HR, heart rate. Ang II, angiotensin II; ET-1, endothelin-1. **P* < 0.05 as compared to control. †*P* < 0.05 as compared to Ang II. ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Protein Synthesis Measurement

Quantification of protein synthesis rate was performed according to a protocol described in previous publications.^{4,9,11} Results are expressed as cpm/mg of proteins and represent the vascular protein synthesis rate over a period of 4 hours.

Drugs and Statistical Analysis

Ang II was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), while ET and AG 1478 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance. Post hoc comparisons were selected a priori and were undertaken using Bonferroni's correction: the Ang II, ET and AG1478 groups were compared to the control group, while the Ang + AG1478 group was compared to Ang, and ET + AG1478 was compared to ET. Differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Administration of AG1478 alone did not modify values of diastolic blood pressure, systolic blood pressure, mean blood pressure and heart rate (Table 1). Following 26 hours of Ang II stimulation, diastolic blood pressure, systolic blood pressure and mean blood pressure were augmented compared to the control group. In the Ang + AG1478 group, the hemodynamic values were intermediate between control and Ang II (NS vs Ang II). Exogenous infusion of ET-1 did not produce significant effects on hemodynamic parameters and AG1478 administered in addition to ET had no effect.

In mesenteric arteries, basal protein synthesis was 240 ± 27 cpm/mg, and did not change significantly following AG1478 treatment (Fig. 1A). However, Ang II infusion augmented the rate of protein synthesis by 107%. This effect was blunted by AG1478 treatment administered 5 hours

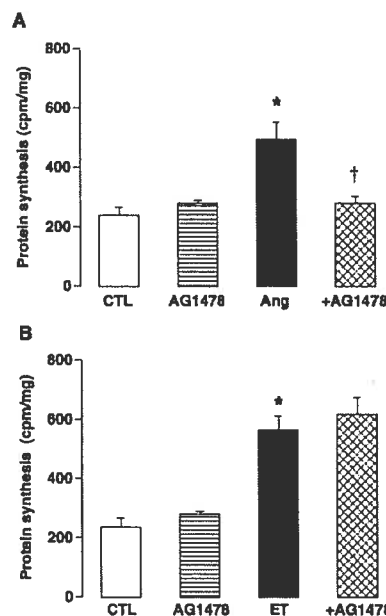


FIGURE 1. (A) Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from control rats (CTL), rats treated with AG1478, rats treated for 26 hours with angiotensin II (Ang II) alone or with Ang II + AG1478. (B) Protein synthesis rate measurement in small mesenteric arteries from CTL, rats treated with AG1478, rats treated for 26 hours with endothelin (ET) or with ET + AG1478. **P* < 0.05 as compared to control, †*P* < 0.05 as compared to respective treatment (Ang or ET). ANOVA + Bonferroni's correction for multiple comparisons.

before harvesting the tissues (Fig. 1A). Exogenous infusion of ET induced a significant elevation of protein synthesis (137%) above control values. In contrast to the Ang II response, AG1478 did not inhibit the effect of ET on the protein synthesis rate (Fig. 1B).

DISCUSSION

Intracellular signaling pathways underlying Ang II-dependent and ET-dependent processes related to growth of vascular smooth muscle cells have been explored extensively in *in vitro* conditions.⁷ Transactivation of EGFR has been proposed as an intermediate for the activation of signaling pathways involved in the control of cellular growth. The main finding of our *in vivo* work in small mesenteric arteries is that only Ang II, but not ET, relies on EGFR transactivation to stimulate vascular protein synthesis.

In line with previous work undertaken in our laboratory,⁹ as well as with *in vitro* work,^{8,12} we confirmed that EGFR transactivation is essential in Ang II-induced

vascular protein synthesis in resistant arteries. Indeed, AG1478 blunted significantly Ang II-stimulated vascular protein synthesis. Our observations are in line with the evidence supporting a central role for EGFR transactivation in Ang II-induced migration and growth of vascular smooth muscle cells.¹³ Moreover, transactivation of EGFR is required for Ang II-activation of growth signaling such as extracellular signal-regulated kinase 1/2 and PI3 kinase in vascular smooth muscle cells.^{8,12} Transactivation of EGFR has also been suggested either to serve as a scaffolding for preactivated Src tyrosine kinases,¹² or to be activated by Src.⁸ Interestingly, we have preliminary data to suggest that the Src family of tyrosine kinases is also involved in Ang II-induced, but not ET-induced, protein synthesis, suggesting cooperation between the two kinases.¹⁴

Elevation of arterial pressure is known to activate signal transduction mechanisms, which lead to protein synthesis and later to vascular remodeling.^{15,16} Although we observed an elevation of arterial pressure with Ang II, we have previously shown that the enhancement of protein synthesis rate by Ang II is pressure-independent, as it could be inhibited by an ET receptor antagonist that did not reduce the pressure.⁴ In addition, ET stimulation clearly resulted in a pressure-independent increase in protein synthesis, suggesting that pressure elevation is not required to enhance vascular protein synthesis.

Considering the ubiquitous role of ET in the progression of vascular hypertrophic remodeling,⁶ it is quite surprising that few publications have studied vascular remodeling following direct ET stimulation. After demonstrating that ET stimulates small artery protein synthesis *in vivo*,⁴ we are now trying to identify its signaling pathways. In the present work, we were unable to demonstrate that EGFR transactivation is a signaling event involved in ET-stimulated protein synthesis. This is in contrast to what we observed when Ang II was used as the agonist, and also in contradiction to studies in cultured vascular smooth muscle cells, which show a role for EGFR transactivation in ET-induced protein synthesis.¹⁷ The discrepancy could be explained by the approach and we believe that the *in vivo* approach used in the present study is closer to pathophysiological conditions than previous *in vitro* work, by providing a better integration of cellular and local mediator interactions.

Although we have yet to provide definite proof, our results suggest that EGFR transactivation lies in between Ang II and ET to relay the trophic information. Indeed, considering that Ang II requires ET to stimulate protein synthesis,⁴ and that only Ang II requires EGFR transactivation, the transactivation step is likely to lead to the overexpression of ET. We have recently demonstrated that this is exactly the case for Src family kinases.¹⁴ Indeed, blocking this signaling step reduces Ang II-induced

preendothelin expression and protein synthesis, while it is without effect on ET-induced protein synthesis.

CONCLUSION

In the present study we evaluated the contribution of EGFR transactivation in Ang II-induced and ET-induced protein synthesis. Taken together with our previous work demonstrating an interaction between Ang II and ET, the present results suggest that EGFR transactivation is upstream to ET in the cascade leading to protein synthesis. Thus, in ET-mediated small artery remodeling *in vivo*, EGFR transactivation does not play a significant role, although it may relay the signal from the renin-angiotensin system to the ET system.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the excellent technical contribution of Louise Ida Grondin. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). PB receives a stipend from the Canadian Hypertension Society/CIHR and PM is a CIHR scholar.

REFERENCES

1. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991;17:626-635.
2. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation*. 1997;96:1593-1597.
3. Simon G, Illyes G. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, and sympathetic stimulation, alone and in combination in rats. *Hypertension*. 2001;37:255-260.
4. Beaucage P, Yamaguchi N, Lariviere R, et al. Heterogeneity in the acute control of vascular protein synthesis *in vivo*. *J Vasc Res*. 2003;40:123-131.
5. Moreau P, Laplante MA, Beaucage P, et al. Angiotensin-endothelin interactions. In: Unger T, Schölkens B, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology: Angiotensin, Section 1: Gene Aspects*. Unger T, Schölkens BA (eds). Berlin: Springer-Verlag; 2004, 163/1:149-170.
6. Moreau P, Schiffrin EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:511-521.
7. Touyz R, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52:639-672.
8. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney Int*. 2000;58:549-558.
9. Voisin L, Foisy S, Giasson E, et al. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C446-C455.
10. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, et al. Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:139-150.
11. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, et al. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension*. 2002;39:16-21.
12. Touyz RM, Wu XH, He G, et al. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39:479-485.

13. Saito S, Frank GD, Motley ED, et al. Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;280:1116–1119.
14. Beaucage P, Touyz R, Moreau P. In vivo investigation of the role of Src in the vascular trophic action of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension.* 2002;40:392.
15. Rice DC, Dobrian AD, Schriver SD, et al. Src autophosphorylation is an early event in pressure-mediated signaling pathways in isolated resistance arteries. *Hypertension.* 2002;39:502–507.
16. Xu Q, Liu Y, Gorospe M, et al. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest.* 1996;97:508–514.
17. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, et al. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology.* 1999;140:4659–4668.

